ORSAY
N° d'ordre

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

THESE

PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Yann GAUDUEL

.—.

ASPECTS FONCTIONNELS ET CYTOTOXIQUES DE L'UTILISATION DE L'OXYGENE PAR LE TISSU CARDIAQUE .

.—.

soutenue le 6 DECEMBRE 1983 devant la Commission d'examen

Mme	D. GAUTHERON	Président
MM	J. de LEIRIS	Rapporteur
	B. ROSSIGNOL	
	M. DUVELLEROY	
	A. PIWNICA	
	M. BURGEAT	
Mme	K. SCHWARTZ	

LEIDEN

ORSAY
N°d'ordre

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

THESE

PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Yann GAUDUEL

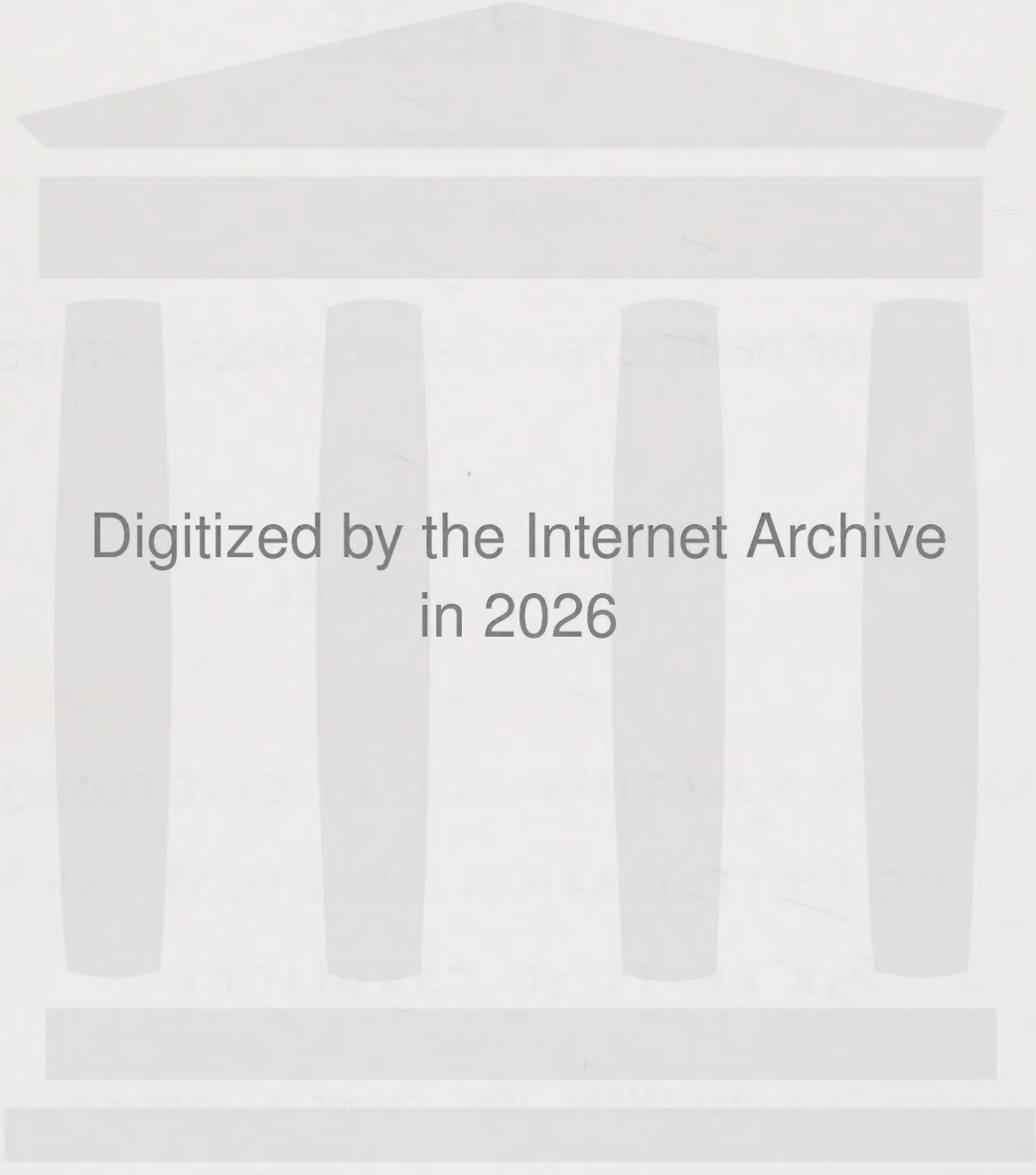
.—.

ASPECTS FONCTIONNELS ET CYTOTOXIQUES DE L'UTILISATION DE L'OXYGENE PAR LE TISSU CARDIAQUE .

.—.

soutenue le 6 DECEMBRE 1983 devant la Commission d'examen

Mme	D. GAUTHERON	Président
MM	J. de LEIRIS	Rapporteur
	B. ROSSIGNOL	
	M. DUVELLEROY	
	A. PIWNICA	
	M. BURGEAT	
Mme	K. SCHWARTZ	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543524_0001

A Catherine,
qui assume le difficile rôle
d'épouse de chercheur.

A mes Parents.

REMERCIEMENTS,

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biophysique,
Hôpital Fernand Widal, Paris.

Madame le Professeur D. GAUTHERON me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Sa compétence scientifique est un exemple. Qu'elle veuille bien trouver dans ces lignes l'expression de ma respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur J. de LEIRIS a bien voulu accepter la charge de rapporteur. Ses premiers conseils ont eu valeur de guide et son amical soutien fût un encouragement à poursuivre dans la recherche. Qu'il reçoive , ici, le témoignage de toute ma reconnaissance et de mon amitié.

Ce travail doit beaucoup à Monsieur le Professeur M. DUVELLEROY pour la confiance qu'il m'a accordée en m'intégrant à son laboratoire. Ses encouragements et sa grande connaissance du langage biophysique ne sont pas étrangers à la réussite de cette étude. Je lui exprime mes remerciements très amicaux.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur M. BURGEAT qui m'a largement ouvert les portes de son service de Biophysique et de Médecine Nucléaire et ainsi permis d'élargir mes connaissances en biophysique.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur le Professeur A. PIWNICA. Sa présence dans ce jury témoigne de la nécéssité d'un réel dialogue entre fondamentalistes et cliniciens.

Monsieur le Professeur B. ROSSIGNOL et Madame K. SCHWARTZ ont bien voulu s'intéresser à ce travail et me faire l'honneur de participer à ce jury. Je les en remercie vivement.

Que J.L. MARTIN soit assuré de ma sincère reconnaissance pour ses encouragements et son amical soutien.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Docteur M. DURUBLE, B. TEISSEIRE et O. CHARANSONNEY qui m'ont apporté, au sein du laboratoire de biophysique, une aide amicale et précieuse.

L'aboutissement de ce travail me donne l'occasion de témoigner ma reconnaissance à tous ceux qui en ont permis la réalisation et particulièrement à Madame M.C. BEGUE pour sa contribution administrative.

J'exprime tous mes remerciements à Madame DELERUE qui a assuré, avec une grande efficacité, la dactylographie et la mise en page de ce manuscrit.

SOMMAIRE

PAGE

INTRODUCTION GENERALE 1

PREMIÈRE PARTIE

LIMITE AEROBIE DE LA FONCTION CARDIAQUE : ADAPTATION A UNE VARIATION DE LA CONCENTRATION ARTÉRIELLE EN OXYGENE.

CHAPITRE I : ÉTUDES THÉORIQUES ET EXPÉRIMENTALES DE L'OXYGÉNATION MYOCARDIQUE 5

I-A : INTRODUCTION 5

I-B : TRANSPORT CIRCULATOIRE DE L'OXYGENE AU MYOCARDE 9

I-B.1 : Oxygène et hémoglobine

I-B.2 : Distribution tissulaire de l'oxygène

I-C : UTILISATION DE L'OXYGENE PAR LE MUSCLE CARDIAQUE 18

I-C.1 : Les voies d'entrée du métabolisme énergétique

I-C.2 : Oxygène et énergétique cellulaire

CHAPITRE II : CONDITIONS EXPÉRIMENTALES 29

II-A : PREPARATION DE L'ANIMAL 29

II-B : PROTOCOLE DE PERFUSION 29

II-B.1 : Canulations

II-B.2 : Circuit de perfusion

II-B.3 : Milieux de perfusion

II-C : PROTOCOLE EXPERIMENTAL 34

II-D : ECHANTILLONNAGES ET TECHNIQUES DE DOSAGE 38

II-D.1 : Protocoles de prélèvements

II-D.2 : Analyses des échantillons de perfusat

II-D.3 : Analyses des échantillons tissulaires

II-E : ANALYSES STATISTIQUES 46

CHAPITRE III : RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET DISCUSSION 47

III-A : RESULTATS HEMODYNAMIQUES 47

III-A.1 : Analyse en transitoire

III-A.2 : Performances cardiaques en régime stationnaire

III-B : ACTIVITE METABOLIQUE DU MYOCARDE 55

III-B.1 : Utilisation des substrats exogènes

III-B.2 : Activité glycolytique du myocarde

III-B.3 : Métabolisme énergétique du myocarde

III-B.4 : Relations fonction cardiaque-activité métabolique

III-C : DISCUSSION 61

CHAPITRE IV : RÉSULTATS THÉORIQUES : MODÈLE MATHÉMATIQUE 74

IV-A : INTRODUCTION 74

IV-B : EQUATIONS DU MODELE 76

IV-B.1 : Equations différentielles de l'oxygène

IV-B.2 : Equations différentielles des cinétiques chimiques

IV-B.3 : Equations différentielles du sous-compartiment Z

IV-B.4 : Equations des régulations enzymatiques

IV-B.5 : Equation du débit coronaire

IV-B.6 : Définition des paramètres utilisés dans les équations du modèle

IV-C : INTRODUCTION DES PERTURBATIONS SUR LE MODELE 84

IV-D : RESULTATS ET DISCUSSION 85

CHAPITRE V : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION 88

---/---

DEUXIÈME PARTIE

CYTOTOXICITÉ DE L'OXYGÈNE AU NIVEAU DU MYOCARDE HYPOXIQUE.

CHAPITRE I : APERÇUS SUR LA CYTOTOXICITÉ DE L'OXYGÈNE MOLÉCULAIRE 97

I-A : INTRODUCTION HISTORIQUE 97

I-B : MECANISMES IMPLIQUES DANS LA TOXICITE DE L'OXYGENE 100

I-B.1 : Oxygène moléculaire et radicaux

I-B.2 : Peroxydations lipidiques

I-C : MECANISMES CONTROLANT LA CYTOTOXICITE DE L'OXYGENE 109

CHAPITRE II : PROTOCOLES EXPERIMENTAUX 113

II-A : TECHNIQUE DE PERFUSION 113

II-B : DECOURS DES PERFUSIONS 114

II-C : ECHANTILLONNAGES ET TECHNIQUES DE DOSAGES 116

CHAPITRE III : RÉSULTATS : CATÉCHOLAMINES ENDOGÈNES ET HYPOXIE DU MYOCARDE ; CONSÉQUENCES SUR LA CYTOTOXICITÉ DE LA RÉOXYGÉNATION. 124

III-A : INTRODUCTION 124

III-B : RESULTATS ET DISCUSSION 150

CHAPITRE IV : RÉSULTATS : ALTÉRATIONS PEROXYDATIVES DU MUSCLE CARDIAQUE RÉOXYGÉNÉ. 152

IV-A : CONSEQUENCES DE L'HYPOXIE 152

IV-B : CYTOTOXICITE DE LA REOXYGENATION ET PEROXYDATIONS LIPIDIQUES 155

IV-C : PEROXYDATIONS LIPIDIQUES ET RADICAUX DE L'OXYGENE 164

IV-C.1 : Radical hydroxyle et singulet oxygène

IV-C.2 : Rôle de l'ion superoxyde

IV-D : MITOCHONDRIES ET CYTOTOXICITE DE LA REOXYGENATION 180

CHAPITRE V : DISCUSSION ET CONCLUSIONS. 188

V-A : INTRODUCTION 188

V-B : PEROXYDATIONS LIPIDIQUES ET REOXYGENATION 189

V-C : ROLE DES RADICAUX DE L'OXYGENE AU COURS DE LA REOXYGENATION 190

V-D : ROLE DES MITOCHONDRIES AU MOMENT DE LA REOXYGENATION 195

V-E : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS 198

V-F : PERSPECTIVES D'AVENIR 203

BIBLIOGRAPHIE : 205

ANNEXE 230

A B R E V I A T I O N S

ACETYL CoA	: Acétyl coenzyme A
ACYL CoA	: Acyl coenzyme A
A D P	: Adénosine 5'-diphosphate
A M P	: Adénosine 5'-monophosphate
3' 5' AMP_C	: Adénosine 3'-5'-monophosphate cyclique
A N P	: Adénosine mono, di et triphosphate
A T P	: Adénosine 5'-triphosphate
C K	: Créatine kinase (EC.2.7.3.2)
C P	: Créatine phosphate
$CYtC^{2+}$, $CYtC^{3+}$	: Cytochrome C (forme réduire et oxydée)
E D T A	: Acide étylène diamino tétracétique
FAD^+, $FADH_2$	: Flavine adénine dinucléotide (forme oxydée et réduite)
F.1.6-di P	: Fructose 1.6 di phosphate
G6-P	: Glucose 6-phosphate
G6 PDH	: Glucose 6-phosphate déshydrogénase (EC.1.1.1.49)
GPT	: Transaminase glutamique pyruvique (EC.2.6.1.2.)
GSH, GSSG	: Glutathion (forme réduite et oxydée)
$^1\Delta_g O_2$	: Oxygène moléculaire, état singulet
$H_2 O_2$	: Hydrogène peroxyde
H K	: Hexokinase (EC. 2.7.1.1.)
Hte	: Hématocrite
L D H	: Lactate déshydrogénase (EC.1.1.1.27)
M D A	: Malonaldéhyde
M V O_2	: Consommation myocardique d'oxygène
NAD^+, NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée et réduite)
O_2^-	: Anion superoxyde

$OH^{\cdot}$	: Radical hydroxyle
P A M	: Pression aortique moyenne
P F K	: Phosphofructokinase (EC, 2.7.1.11)
Pi	: Phosphate inorganique
PCO_2	: Pression partielle en gaz carbonique
PO_2	: Pression partielle en oxygène
POG	: Pression auriculaire gauche
QO_2	: Consommation mitochondriale d'oxygène (stade 3 ou 4)
$RO^{\cdot}$	: Radical alkoxy
$ROO^{\cdot}$	: Lipide peroxyde
ROOH	: Lipide hydroperoxyde
R C I	: Indice de contrôle respiratoire
SOD	: Superoxyde dismutase (EC.1.15.1.1)
SO_2T	: Débit d'oxygène transporté
T C A	: Acide trichloracétique
Tris	: Hydroxyméthyl-amino-méthane

INTRODUCTION GENERALE

Depuis les premiers travaux expérimentaux de YEO (1885), il est admis que le muscle cardiaque travaillant est un important consommateur d'oxygène qui possède un métabolisme adapté pour soutenir une activité aérobie (BRAUNWALD, 1971) : grande teneur tissulaire d'enzymes oxydatifs, abondance des mitochondries qui représentent 25 à 30% de la masse cellulaire, pourcentage d'extraction de l'oxygène élevé (65 à 75%).

La consommation cardiaque d'oxygène est liée essentiellement à l'activité du ventribule gauche qui peut représenter 7 % de la consommation basale d'oxygène. Les facteurs déterminants de l'utilisation de l'oxygène par le coeur sont : l'augmentation de la fréquence cardiaque, la mise en tension du muscle, le métabolisme de base, le travail systolique externe, l'état inotrope et l'énergie d'activation des processus de dépolarisation membranaire (BRAUNWALD, 1976).

Les problèmes de l'oxygénation du myocarde regroupent l'ensemble des mécanismes de distribution de l'oxygène au tissu et les processus d'utilisation de ce substrat dans le compartiment cellulaire. Les apports en oxygène du muscle cardiaque sont définis par un ajustement entre la résistance vasculaire du circuit coronaire et le pourcentage d'extraction de l'oxygène. Ces deux facteurs représentent la "réserve métabolique" du myocarde. Les besoins en oxygène répondent à la nécessité d'une conversion de l'énergie chimique en travail mécanique. Ils sont donc très dépendants des réactions oxydatives des cellules.

La quantité d'oxygène disponible pour le tissu cardiaque et surtout pour les mitochondries, est déterminée par la concentration artérielle en oxygène, elle-même dépendante de la concentration en hémoglobine, par le débit circulatoire (débit coronaire) et par la distribution et les caractéristiques de la microcirculation. Lorsque l'un de ces paramètres est diminué pour une raison ou pour

une autre, la réserve métabolique du myocarde devient réduite. Si, parallèlement, la demande métabolique est maintenue ou augmentée, il apparaît un point limite ou "limite aérobie" au cours de laquelle les apports en oxygène ne peuvent satisfaire les besoins réels (WEBER et JANICKI, 1979). Cette limite aérobie du myocarde est d'autant plus vite atteinte que la réserve métabolique est faible. Dans ces conditions, existe-t-il encore une oxygénation adéquate du compartiment intracellulaire ?.

Les interelations entre les apports et les besoins en oxygène sont transposables aux relations qui existent entre le concept d'offre et de demande métaboliques. Ces relations restent fondamentales dans toutes les considérations sur la détermination des capacités mécaniques du muscle cardiaque. Ce fait est particulièrement vrai pour les états hypoxiques ou ischémiques au cours desquels un déséquilibre entre les apports en oxygène et les besoins tissulaires apparaît. En hypoxie, la distribution de l'oxygène au myocarde est limitée par une détérioration des qualités du sang en tant que vecteur d'oxygène. Le débit circulatoire local est, le plus souvent, normal ou augmenté. En revanche, l'état ischémique correspond à une diminution des apports en oxygène par le biais d'une réduction partielle ou totale du débit circulatoire local. Les conséquences d'une hypoxie ou d'une ischémie sont considérables pour le myocarde : diminution des performances hémodynamiques, appauvrissement des réserves énergétiques et apparition de l'altération de l'intégrité des cellules (BRAASCH et al. 1968; RUSHMER, 1969; SOBEL et al. 1972; SHELL et al. 1973; KERBER et ABBOUD 1975; WILLIAMSON et al. 1976; HEYNDRICKX et al. 1978; GANOTE et al. 1982).

Parmi les nombreuses questions non encore totalement résolues, le problème de la réversibilité de l'état hypoxique ou ischémique fait l'objet de nombreuses études. L'irréversibilité peut être caractérisée par une impossibilité de récupération de la fonction cardiaque au moment de la réoxygénation ou de la reperfusion. La détermination de cette frontière entre réversibilité et irréversibilité est apparue plus compliquée par le fait que l'oxygène présente des effets cytotoxiques (effet paradoxal de l'oxygène) dont les conséquences en chirurgie cardiaque sont très importantes (SCHAPPER et

al. 1977; LEFER et al. 1981; SHLAFER et al. 1982 b). Les recherches sur la protection myocardique se sont intensifiées afin d'allonger le temps d'ischémie globale au cours de la chirurgie à coeur ouvert et de favoriser au maximum une récupération de la fonction contractile au moment de la reperfusion. Il semble que la cardioplégie chimique associée à l'hypothermie réponde aux critères d'une protection efficace du myocarde ischémique (HEARSE et al. 1975 a, 1977 b, 1980; MENASCHE et al. 1979, 1980; BUCKBERG 1979; GANOTE et al. 1982; SHLAFER et al. 1982 a).

Lorsque l'on aborde les problèmes de l'oxygénation du myocarde, on est en présence d'une apparente contradiction entre les conséquences de la limite aérobie sur la fonction myocardique et les effets cytotoxiques de l'oxygène moléculaires. Cette contradiction n'est qu'apparente et c'est pour tenter d'en définir ses limites que nous avons entrepris ce travail expérimental et théorique.

Nous avons cherché à répondre à plusieurs questions :

- quels sont les signes intracellulaires d'une limite aérobie de la fonction myocardique ?
- quelles sont les causes de la cytotoxicité de l'oxygène moléculaire sur le myocarde hypoxique ?

A travers ces questions, c'est le problème de la régulation de l'utilisation de l'oxygène par le myocarde qui est posé. En effet, la frontière entre l'état aérobie et l'état hypoxique reste difficile à cerner et il existe probablement des conditions d'oxygénation qui favorisent soit l'apparition d'une limite aérobie (déficience de la réserve métabolique) soit l'effet cytotoxique de l'oxygène (saturation des capacités oxydatives des cellules ou anomalies des réactions d'oxydo-réduction). Ce travail s'intéresse donc au sort de l'oxygène au delà de la circulation capillaire et aborde le métabolisme cellulaire et moléculaire de l'oxygène dans le muscle cardiaque.

PREMIERE PARTIE

LIMITE AEROBIE DE LA FONCTION CARDIAQUE:

ADAPTATION A UNE VARIATION DE LA CONCENTRATION ARTERIELLE EN OXYGENE.

CHAPITRE I

ETUDES THEORIQUES ET EXPERIMENTALES DE L'OXYGENATION MYOCARDIQUE.

I-A. INTRODUCTION

Le rôle de l'oxygène dans le maintien de l'activité cardiaque est essentiel. Comme pour la plupart des tissus vivants, un équilibre dynamique est indispensable entre les apports et les besoins réels en oxygène du myocarde. C'est à cette nécessité que doit répondre l'autorégulation de la fonction cardiaque.

Depuis les travaux expérimentaux de LANGENDORFF (1895) sur les conditions de survie du muscle cardiaque perfusé par voie aortique rétrograde, l'interdépendance fonction cardiaque-oxygénation n'a cessé d'être, un peu plus chaque jour, confirmée : EVANS et MATSUOKA (1914), HEMINGWAY et FEE (1927), HARRISON et al. (1936), LAURENT et al. (1956), SARNOFF et al. (1958), SONNENBLICK et al. (1965), NEELY et al. (1967), GAMBLE et al. (1970), BAKKER et al. (1976), DUVELLEROY et al. (1976), WEBER (1979).

L'adaptation de la fonction cardiaque aux conditions extrinsèques d'oxygénation a été envisagée aux niveaux vasculaire et tissulaire.

En 1964, GUYTON montre qu'il existe un contrôle de l'oxygène apporté par le circuit vasculaire en fonction des réels besoins en oxygène des cellules. La distribution de l'oxygène au myocarde est assurée par la convection circulatoire et la diffusion intratissulaire. Le réseau coronaire assure l'essentiel de la convection circulatoire. Depuis les travaux de JONES et BERNE (1964, 1965), BERNE et al. (1957, 1963, 1964), il est admis qu'une régulation existe entre le débit coronaire et l'état d'oxygénation du myocarde. Cet état est le résultat d'un équilibre dynamique entre les apports et les besoins en oxygène des cellules cardiaques. La boucle de régulation entre débit coronaire et besoins tissulaires en oxygène prend toute sa signification lorsque les conditions extrinsèques d'oxygénation du tissu cardiaque sont modifiées par un changement de la concentration artérielle en oxygène, ou de la PO_2 artérielle, ou par une variation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (P50) : DUVELLEROY et al. (1981).

Une question fondamentale ne cesse de faire l'objet de travaux théoriques et expérimentaux : comment s'effectue la régulation extrinsèque de l'oxygénation myocardique ?

La ou les réponses à apporter à cette question reposent sur un concept : l'adaptation du lit vasculaire cardiaque obéit aux exigences des besoins en oxygène et passe par la mise en oeuvre d'une autorégulation du débit coronaire.

Une composante métabolique de cette autorégulation a été proposée par BERNE et al. (1957) (1963). Tout trouble de l'oxygénation myocardique (quel qu'en soit la cause) est ressenti par les cellules comme une souffrance fonctionnelle. Celles-ci répondent en relargant dans le réseau coronaire une substance vasodilatatrice, l'adénosine, susceptible d'agir localement sur le débit sanguin. RUBIO et al. (1969), OLSSON (1970), (1976),

DOBSON et al. (1971) démontrèrent la propriété vasomotrice de l'adénosine sur le lit coronaire. Le mécanisme d'action de cette substance passerait par une interaction avec des récepteurs identifiés et localisés à la surface des myocytes coronaires (OLSSON et al. 1976; SCHRADER et al. 1977).

D'autres substances chimiques a action vasomotrice ont également été suggérées pour agir sur le débit coronaire : le gaz carbonique (CASE et al. 1976, 1978); le potassium (DAWES 1941; LOWE et THOMPSON 1962 ; SKINNER et COSTIN 1971 ; BUNGER et al. 1976 ; SPARKS et BELLONI 1978) l'osmolarité (GAZITUA 1971) et les prostaglandines (DUSTING et al. 1979).

La seconde hypothèse relative à la régulation coronaire ferait appel à un effet direct de l'oxygène sur le réseau coronaire. La tonicité des fibres lisses des artérioles est fonction de la pression partielle en oxygène. Cette tonicité diminue lorsque la PO_2 diminue et inversement (KOVALCIK 1963 ; CARRIER et al. 1964 ; DETAR et BOHR 1968).

Les travaux de DULING (1970) montrent une modification du diamètre des artérioles sous l'effet de la PO_2 artériolaire. La microcirculation et par voie de conséquence la densité capillaire est donc sensible aux fluctuations de la PO_2. Une diminution de cette PO_2 entraîne une diminution des distances intercapillaires (MARTINI et HONIG 1969). Cette adaptation de la densité capillaire dans la régulation de la circulation coronaire semble être confirmée par les études de PREWITT et JOHNSON (1976), ARCHIE (1977).

Des facteurs mécaniques ont également été mis en cause dans la régulation de la circulation coronaire et de l'oxygénation myocardique. La pression de perfusion influe sur la résistance coronaire (ECKENHOFF 1947) (DRISCOL et al. 1964). Au cours d'un cycle cardiaque, la circulation coronaire subit des fluctuations et

l'optimum de la circulation est obtenue avant le développement du pic de l'onde de pression systolique (OLSSON,1981)

L'utilisation de modèles expérimentaux de coeurs isolés et perfusés est intéressante car elle permet d'étudier les caractéristiques de cet équilibre entre activité fonctionnelle et oxygénation myocardique. Depuis la mise au point de la technique de coeur isolé et travaillant (NEELY et al. 1967), de nombreux auteurs ont tenté d'étudier les mécanismes qui relient les performances cardiaques (mécaniques et métaboliques) et le degré d'oxygénation tissulaire. De tels modèles expérimentaux ont également permis d'étudier la réponse ischémique (HEARSE et al. 1977), l'adaptation du myocarde à des conditions hypoxiques(KAO et al. 1976)(HEARSE et al. 1976) et l'effet de l'activité mécanique sur l'utilisation des substrats métaboliques (NEELY et al. 1967, a, b, 1973; OPIE 1965; TAEGTMEYER et al. 1980).

Toutes ces études sont effectuées avec des conditions d'oxygénation qui dépendent de la nature même du perfusat utilisé. Lorsqu'une solution électrolytique draïne le lit coronaire, l'apport en oxygène se fait avec une PO_2 artérielle élevée (600-700 mm Hg) mais avec une faible concentration artérielle en oxygène. Ces conditions d'oxygénation représentent un cas limite car la capacité du perfusat est nulle et toute diminution de la PO_2 artérielle entraîne une réduction proportionnelle de la concentration artérielle en oxygène.

La présence d'hémoglobine dans le compartiment vasculaire augmente la concentration artérielle d'oxygène et permet de modifier la convection circulatoire d'oxygène en agissant sur la PO_2 artérielle, la concentration en oxygène ou sur l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (DUVELLEROY et al. 1976, 1980). Pour ces raisons, le développement et la mise au point d'une technique de coeur isolé oxygéné par du sang sont essentiels.Les premiers travaux

de GAMBLE et al. (1970) dans ce domaine, ont été complétés par ceux de DUVELLEROY et al. (1976, 1980), BERGMANN et al. (1979), RAND et al. (1979), GAUDUEL et al. (1982).

Le but de la première partie de ce travail est de mettre en évidence le rôle de la concentration artérielle en oxygène dans l'adaptation mécanique et métabolique du muscle cardiaque.

Cette étude de la réponse cardiaque à des variations de la concentration artérielle en oxygène a été effectuée sur un modèle original de coeur perfusé mis au point dans le laboratoire. Des cinétiques d'adaptations sont obtenues grâce au contrôle du protocole de perfusion par un ordinateur.

Avec les résultats expérimentaux seront présentés les résultats d'une étude théorique. Cette modélisation permet de proposer un schéma de régulation de la fonction myocardique.

I-B. TRANSPORT CIRCULATOIRE DE L'OXYGENE AU MYOCARDE.

I-B.1 - Oxygène et hémoglobine

L'oxygène moléculaire utilisable par les tissus vivants est transporté par le sang sous forme dissoute et sous forme combinée à l'hémoglobine (Hb_{O_2}).
La loi de solubilité des gaz dans un milieu liquide (Loi de HENRY) permet de calculer la concentration d'oxygène dissout dans une phase aqueuse à partir de la pression partielle d'oxygène (PO_2) et de son coefficient de solubilité. Le volume v d'oxygène dissout dans un volume V de liquide est donc défini par la formule :

$$v = \alpha PO_2 V$$

La quantité d'oxygène combiné à l'hémoglobine dépend également de la pression partielle d'oxygène, mais l'allure sigmoïde de la

courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine donne une relation non linéaire entre la concentration en oxygène et la pression partielle (PO_2). La courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine peut être déterminée expérimentalement (DUVELLEROY et al. 1970) mais également décrite par de nombreuses expressions (DEFARES et VISSER 1962; KELMAN 1966). Nous avons utilisé ici celle de DEFARES et VISSER dans laquelle le pourcentage de saturation de l'oxy-hémo globine (s) est fonction de la pression partielle d'oxygène (PO_2) et d'un paramètre δ :

$$s = (1 - e^{- \delta PO_2})^2$$

La pression partielle d'oxygène ($PO_2 = P_{50}$) pour laquelle la saturation est égale à 0,5 permet de définir le paramètre :

$$\delta = 1.23/P_{50}$$

La concentration totale en oxygène du sang se résume par l'équation:

$$C_{O2} = 310^{-5} PO_2 + Cap.s = 310^{-5} PO_2 + Cap\ (1- e^{- \delta PO_2})$$

Dans cette expression, la concentration en oxygène est exprimée en litre O_2/litre (STPD), la PO_2 en mmHg et la capacité en litre O_2/litre. La capacité maximale en oxygène combiné est définie par une saturation égale à 1 et est égale au produit du pouvoir oxyphorique (1.34 ml O_2/gramme d'hémoglobine) par la concentration en hémoglobine (g/litre)

$$Cap = 1.34\ (Hb)$$

Du fait que la concentration en hémoglobine est liée à la valeur de l'hématocrite, la capacité en oxygène combiné (Cap) est directement proportionnelle à l'hématocrite.

I-B.2 - Distribution tissulaire de l'oxygène.

Dans les tissus et en particulier dans le tissu cardiaque, l'oxygène transporté par le sang se distribue dans les capillaires fonctionnels, et diffuse vers les sites d'utilisation cellulaire .

De nombreux modèles de distribution tissulaire de l'oxygène ont été proposés : KROGH (1919), GRANGER (1973), ARCHIE (1977), DUVELLEROY et al. (1973, 1981). Ces études théoriques ont été confrontées et discutées en fonction des résultats expérimentaux obtenus par d'autres auteurs : HONIG et BOURDEAU-MARTINI (1973, 1974), HONIG et al. (1977), ARCHIE (1978), HENQUELL et HONIG (1976), MARTINI et al. (1979), MARTIN et al. (1979), HENQUELL (1980).

Dans la plupart de ces modèles, un capillaire unique est entouré par un cylindre tissulaire. A l'intérieur du capillaire, la PO_2 décroit depuis l'extrêmité artérielle jusqu'à l'extrêmité veineuse. L'essentiel du déplacement de l'oxygène en dehors du compartiment vasculaire repose sur la diffusion de l'oxygène dissout et, pour le cas du myocarde, sur la diffusion de l'oxymyoglobine.

Le modèle théorique décrit par KROGH (1919) montre que de nombreux paramètres interviennent sur la diffusion tissulaire de l'oxygène : concentration d'oxygène à l'entrée du compartiment vasculaire, calibre du capillaire, constante de diffusion de l'oxygène dans le tissu, consommation tissulaire d'oxygène. La diffusion de l'oxygène dans le tissu entraîne un décrément longitudinal de la PO_2 capillaire (DULING et BERNE 1970). Cette PO_2 capillaire moyenne est plus proche de la PO_2 veineuse que de la PO_2 artérielle. Avec un tel concept, les forces de diffusion de l'oxygène, du capillaire vers le tissu, sont engendrées par des gradients de pressions partielles : gradient transversal de la PO_2 tissulaire et gradient longitudinal de la PO_2 capillaire. La plupart des auteurs s'accordent pour considérer que le gradient transversal est dominant. En conséquence, la force résultante de diffusion de l'oxygène dans le tissu a une direction quasi-radiale (figure 1). Si l'on admet une homogénéité de l'oxygénation tissulaire, le modèle de KROGH permet de définir, en tout point

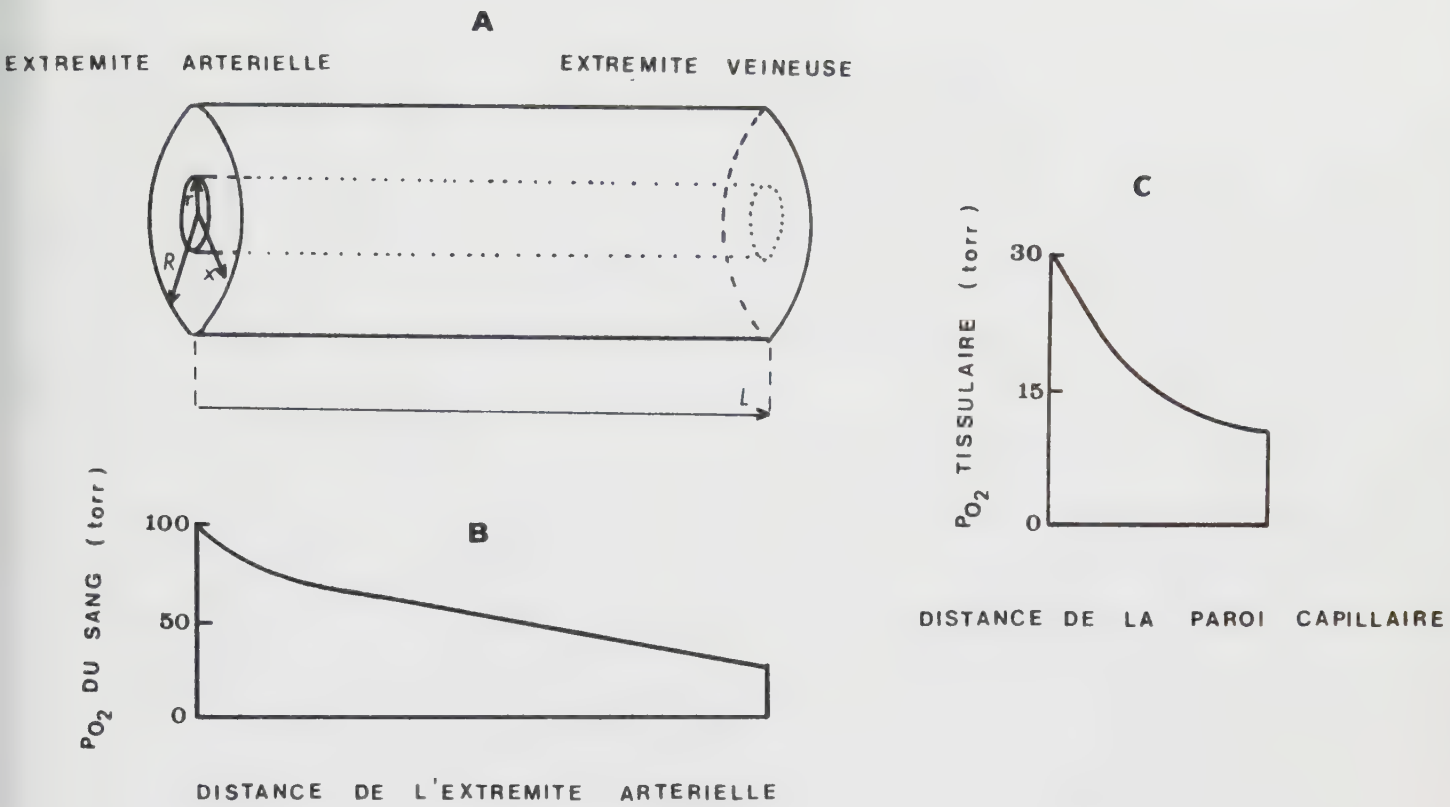


FIGURE 1

Variations spatiales de la PO_2 le long et autour des capillaires .

A. Modèle géométrique de Krogh: chaque capillaire est entouré par un manchon de tissu cylindrique où l'oxygène diffuse de façon radiale.

B. Décrément longitudinal de la PO_2 capillaire.

C. Décrément transversal de la PO_2 tissulaire.

du tissu, une valeur de la PO_2 tissulaire :

$$P = PO - \frac{VO_2}{4g}\left[2\left(\frac{R}{r}\right)^2 \text{Log}\ \frac{X}{r} - \left(\frac{X}{r}\right)^2 + 1\right]$$

avec PO = pression partielle d'oxygène dans le capillaire
P = pression partielle en un point précis du tissu
VO_2 = consommation d'oxygène
r et R = rayons du manchon tissulaire
g = constante de diffusion
X = distance du point à l'axe du capillaire

Bien que le modèle de KROGH ne soit pas entièrement adaptable à tous les cas d'oxygénation tissulaire (OPITZ et SCHNEIDER 1950), l'utilité d'un tel modèle est de permettre de calculer avec une précision acceptable la PO_2 tissulaire et de renseigner sur la distribution de l'oxygène dans un tissu. Il s'agit là d'un avantage sur les études expérimentales, car aucune technique actuelle ne permet de mesurer avec une plus grande précision la PO_2 tissulaire (WHALEN et al. 1973; COBURN et al. 1973). Dans le chapitre suivant, nous reviendrons sur la signification physiologique et métabolique de la PO_2 tissulaire dans le cas du muscle cardiaque.

La plupart des modèles théoriques de distribution tissulaire de l'oxygène utilisent deux types d'équation :

- une équation de convection pour décrire le transport de l'oxygène à l'intérieur du capillaire,
- des équations plus ou moins complexes de diffusion au niveau du cylindre de tissu.

Les résultats de ces calculs se traduisent par des profils de répartition de la PO_2 dans le capillaire et dans le tissu. La figure 2 illustre un résultat classique dans lequel on voit que c'est vers l'extrêmité veineuse à mi-chemin entre deux

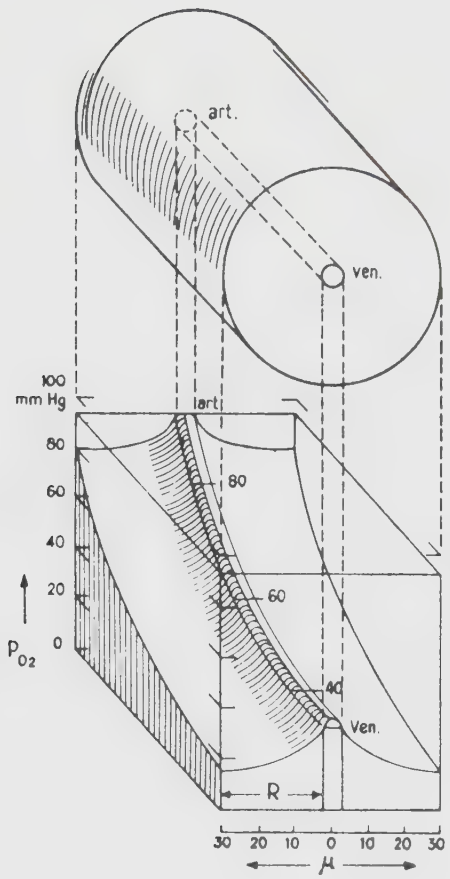


FIGURE 2

Profil de pression partielle en oxygène au niveau d'un capillaire unique entouré d'un cylindre tissulaire.

capillaires, qu'existe la PO_2 tissulaire la plus basse.

L'inconvénient de ces modèles, est de considérer que la consommation d'oxygène est constante; hypothèse que nous ne pouvons pas utiliser dans notre étude, puisque expérimentalement, nous observons des variations de cette consommation. Aussi, avons nous utilisé un modèle dans lequel la consommation d'oxygène n'est pas imposée, mais représente une grandeur calculée (DUVELLEROY et al. 1981). Le système capillaire-tissu est équivalent à deux compartiments (figure 3). L'un des compartiments représente le capillaire et le tissu interstitiel adjacent, l'autre compartiment étant le tissu (figure 3). La pression partielle d'oxygène dans le capillaire est supposée être égale à la pression partielle veineuse. Le déplacement de l'oxygène du compartiment vasculaire (CV) vers le compartiment tissulaire (CT) est décrit par une série de trois équations :

- la consommation d'oxygène du système (VO_2) est calculée par l'équation de convection circulatoire de FICK :

$$VO_2 = Q\ (C_A - CV)$$

  Q = débit circulatoire

  C_A et CV = concentration artérielle et veineuse d'oxygène

- en absence d'une consommation d'oxygène par le milieu sanguin lui-même, cette VO_2 représente également le flux de diffusion de l'oxygène, du capillaire vers le tissu :

$$VO_2 = K\ (P_V - P_T)$$

  $P_T = PO_2$ tissulaire

- cette consommation d'oxygène est supposée obéir à une cinétique Michaelienne :

$$VO_2 = V_M \cdot \frac{P_T}{P_T + P_c}$$

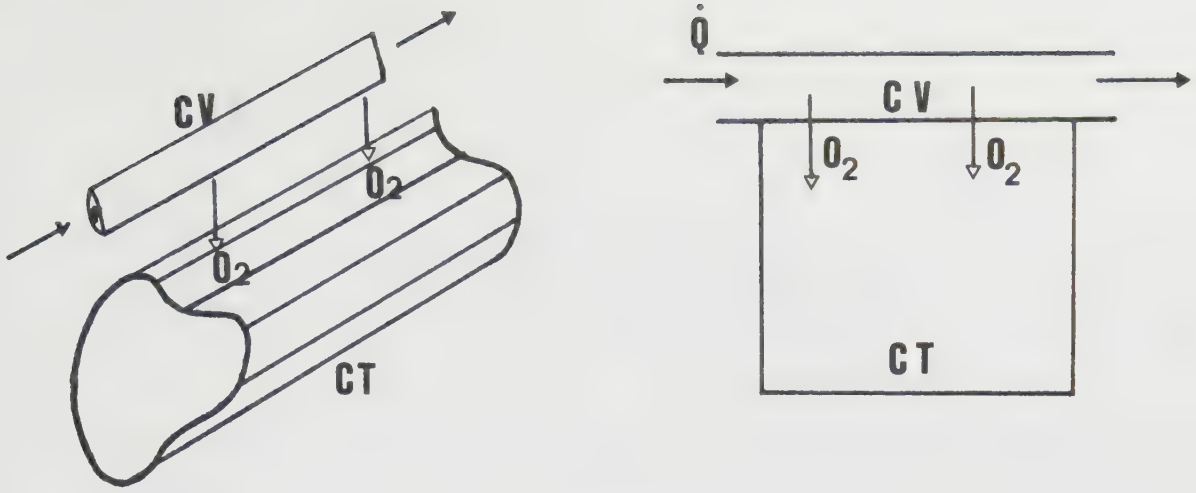


FIGURE 3

Représentation schématique d'une unité fonctionnelle capillaire - tissu.

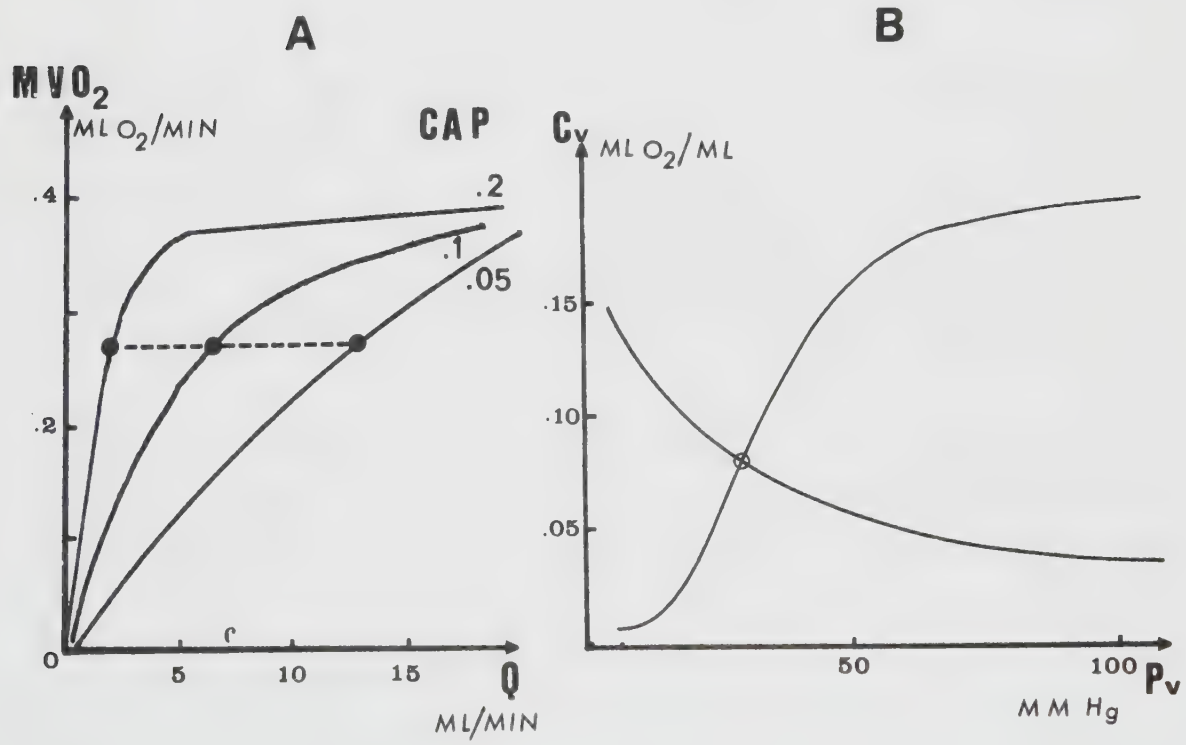


FIGURE 4

Représentations graphiques de solutions du modèle simplifié.

A. MVO_2 augmente avec l'augmentation du débit coronaire. Lorsque la capacité diminue, une même MVO_2 peut être assurée par une élévation compensatrice du débit circulatoire.

B. Solution graphique du modèle de distribution tissulaire de l'oxygène. Le "point veineux" est à l'intersection de la courbe de dissociation de l'hémoglobine et d'une courbe dite de distribution de l'oxygène dont la forme dépend des variables d'entrée C_A, Q, K, V_M et P_C.

avec V_M = consommation maximum d'oxygène pour un état énergétique fixé et $P_C = PO_2$ tissulaire critique telle que $VO_2 = V_M/2$

Le traitement mathématique de ces trois équations définit une équation du second degré qui exprime la PO_2 en fonction de la PO_2 veineuse :

$$P_T^2 + P_T\left(\frac{V_M}{K} + Pc - Pv\right) - Pv\,P_T = 0$$

La solution de cette équation sera :

$$P_T = -\frac{1}{2}\left[\left(\frac{V_M}{K} + Pc - Pv\right) + \sqrt{\left(\frac{V_M}{K} + Pc - Pv\right)^2 + 4Pv\,Pc}\right]$$

En remplaçant P_T par cette expression, l'équation implicite en Pv peut s'écrire :

$$Q\left[Ca - xPv - Cap\left(1-C^{-\left(Pv\right)^2}\right)\right] = K\left[Pv + \frac{\frac{V_M}{K} + Pc - Pv}{2} - \frac{\sqrt{\left(\frac{V_M}{K} + Pc-Pv\right)^2 + 4\,Pv\,Pc}}{2}\right]$$

Dans ce modèle statique simplifié, il est intéressant de noter que la distribution tissulaire de l'oxygène au myocarde tient compte des caractéristiques physiques du sang (PO_2 artérielle, capacité en oxygène, P_{50}), de paramètres biochimiques (V_M et Pc) et de paramètres qui régulent l'oxygénation tissulaire (Q et K). Les variables de sortie de la distribution tissulaire de l'oxygène sont : la PO_2 du sinus veineux coronaire (Pv), la concentration en oxygène du sinus veineux coronaire (Cv), la PO_2 tissulaire (P_T) et la consommation d'oxygène (VO_2). La figure 4 représente deux solutions de ce modèle simplifié.

I-C. UTILISATION DE L'OXYGENE PAR LE MUSCLE CARDIAQUE

I-C.1 - Les voies d'entrée du métabolisme énergétique.

La production d'énergie par les cellules cardiaques est étroitement liée à l'utilisation d'oxygène et à la consommation de substrats exogènes.
Les principales voies d'entrée du métabolisme énergétique cardiaque sont présentées sur la figure 5. L'importance relative des différents métabolismes est fonction de l'état d'oxygénation du tissu cardiaque (OPIE 1968, 1969; NEELY et al. 1970, 1973).

Dans les conditions normales d'oxygénation du muscle cardiaque, le métabolisme lipidique est prédominant (BING et al. 1954; CHALLONER et al. 1966) et nécessite la captation d'acides gras libres par les cellules cardiaques. Cette capacité de captation des acides gras dépend, en partie, du degré d'insaturation de ces molécules. Les lipides sont transformés, dans le cytoplasme en acyl-CoA qui se combinent à des transporteurs (acyl carnitine transférase) afin de franchir la barrière mitochondriale et subir la voie de la Béta-oxydation. Cette voie de dégradation lipidique fournit à la cellule cardiaque des molécules à deux atomes de carbone (acetyl CoA); lesquels sont repris dans le cycle des acides tricarbcxyliques pour fournir des coenzymes réduits (NADH , FADH) susceptibles d'alimenter la phosphorylation oxydative mitochondriale.

En bilan énergétique, le nombre de molécules d'ATP (adénosine triphosphate) produites dépend du nombre d'atomes de carbone dans la molécule de substrat. Ainsi, la dégradation complète d'une molécule d'acide gras à 18 atomes de carbone (molécule de palmitate) produit 129 molécules d'ATP. D'après les travaux de WAREMBOURG et al. (1969), la fourniture d'énergie au myocarde est assurée à 70 ou 80 % par l'utilisation des acides gras libres. Les autres substrats métaboliques fournissant le reste des sources énergétiques

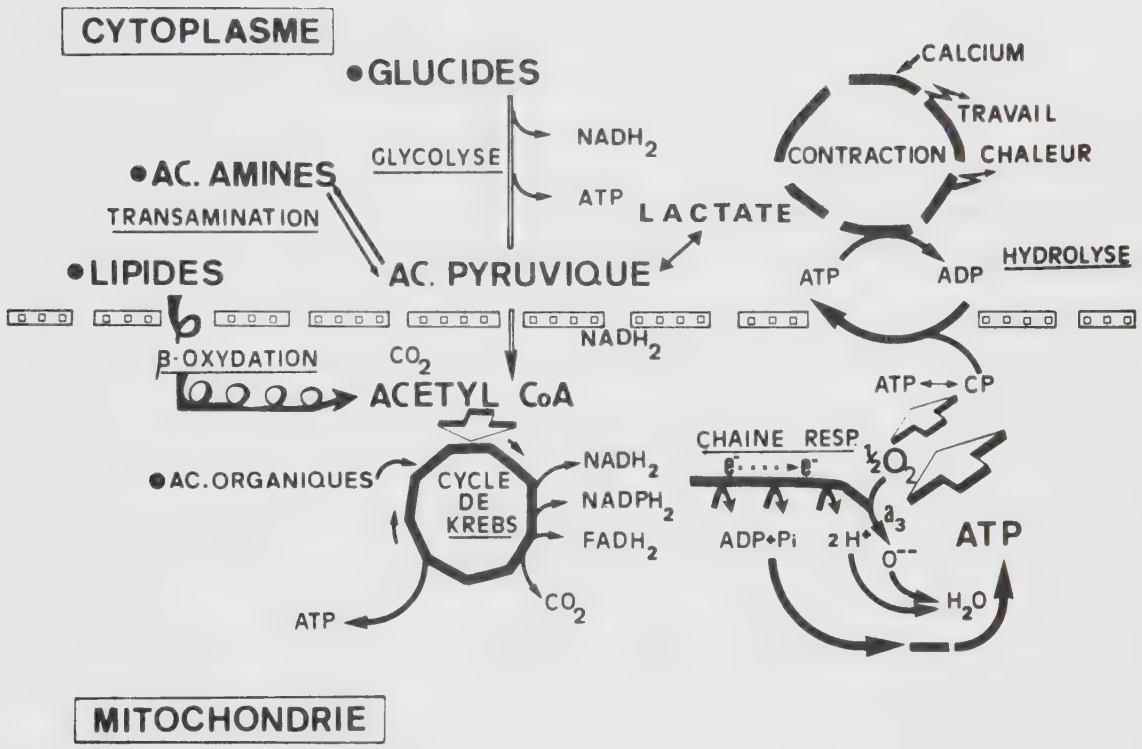


FIGURE 5

Principales voies d'entrée du métabolisme énergétique cardiaque.

du muscle cardiaque normalement oxygéné (Lactate 27 %, Glucose 10 %, Pyruvate 25 %). Le glycogène, glucide abondamment présent dans le myocarde, a un métabolisme très ralenti dans les conditions d'aérobie (MORGAN et PARMEGGIANI, 1964).

Les études consacrées à l'utilisation des acides aminés par le myocarde, restent peu nombreuses. Les travaux de BING et al. (1964) ont montré que le coeur humain est susceptible d'extraire des acides aminés à partir de perfusion d'hydrolysats de protéines. Au repos, le coeur produit de faibles quantités d'alanine à partir d'une consommation de glutamate exogène (MUDGE et al. 1976). L'exercice musculaire augmente la production d'alanine par le myocarde humain (CARLSTEN et al. 1961). Cette synthèse d'alanine, dans les conditions d'aérobie, est stimulée également par la présence de pyruvate exogène (TAEGTMEYER et al. 1977). Plus récemment, TAKALA et al. (1980) ont démontré sur le coeur "in vivo" l'interdépendance du catabolisme des acides aminés avec l'état énergétique cellulaire.

L'importance des différentes voies d'entrée du métabolisme énergétique cardiaque est modifiée par des conditions pathologiques. Les états hypoxiques ou ischémiques correspondent à des perturbations significatives de l'oxygénation tissulaire. Le coeur, pour survivre, doit s'adapter à ces nouvelles conditions d'oxygénation. De nombreux travaux ont été consacrés à l'effet de l'hypoxie (PARMEGGIANI et MORGAN 1964; MANSOUR et MANSOUR 1962; MORGAN et PARMEGGIANI 1964, CORNBLATH et al. 1963; WILLIAMSON 1966; REGEN et al. 1964; OPIE 1968; KUBLER et SPIECKERMAN 1970) ou de l'ischémie sur la glycolyse myocardique (OLSON et al. 1971 1972; ROVETTO et al. 1973). Dans les conditions d'un déficit de l'oxygénation tissulaire, les glucides deviennent les substrats préférentiels du muscle cardiaque (OPIE 1968, 1969; NEELY et al. 1970, 1973) car la glycolyse anaérobie est stimulée (Effet Pasteur). La captation de glucose est stimulée par l'anoxie myocardique (RANDLE et SMITH 1958; MORGAN et al. 1959) et par l'ischémie

(OPIE 1972). Cette stimulation correspond à une accélération du transport membranaire et à une augmentation de la phosphorylation du glucose. L'hypoxie ou l'anoxie du myocarde provoquent une stimulation de la glycolyse par le biais de l'activation de l'héxokinase, de la phosphofructokinase (PFK) et de la pyruvate kinase (DUEDING et MANSOUR 1957; REGEN et al. 1964).
En anaérobiose, la glycogénolyse est également accélérée dans les cellules cardiaques (SUTHERLAND 1951; KREBS et FISHER 1955; CORNBLATH et al. 1961; MORGAN et PARMEGIANNI 1964). Le point de départ de cette accélération de la glycogénolyse est la réduction du stock cellulaire d'ATP et l'augmentation intracellulaire de la concentration des phosphates inorganiques qui stimulent l'activité de la phosphorylase . Par ailleurs, les mécanismes d'activation de la glycogène phosphorylase sont différents au cours de l'anoxie ou de l'ischémie (DOBSON et MEYER 1973).

La glycolyse anaérobie peut être à l'origine d'une grande production de lactate et d'une faible synthèse d'ATP. Simultanément, la synthèse de lactate et le catabolisme de l'ATP engendrent une production d'ion H^+. Cette acidification du myocarde peut secondairement utiliser l'activité de la PFK et ralentir d'autant la glycolyse anaérobie. Par ailleurs, toute accélération de la glycolyse, inhibe en retour, le taux de respiration cellulaire et diminue les capacités cellulaires de synthèse de l'ATP (Effet CRABTREE , SUSSMAN et al. 1980).

Le métabolisme lipidique est également perturbé dans les coeurs anoxiques ou ischémiques (OPIE 1968). La captation d'acides gras devient faible et la dégradation des lipides est bloquée au niveau du cycle de KREBS et de la voie de la βoxydation mitochondriale. Il en résulte une augmentation de la formation de lipides cellulaires (OPIE 1968).
Plus particulièrement, l'anoxie ou l'hypoxie augmentent la concentration cytoplasmique d'acyl CoA. Cette élévation de la concentration d'acyl CoA dans la cellule cardiaque entraîne l'inhibition

de la translocase mitochondriale qui est responsable des transferts énergétiques intracellulaires (SHUG 1973; SHRAGO et al. 1976; HOCHACHKA et al. 1977; WHITMER et al. 1978). Certaines hypothèses sont émises quant à une action éventuelle de l'adénosine cyclique 3',5' monophosphate dans la stimulation de certaines lipases au cours d'une anoxie ou d'une ischémie du myocarde (OPIE 1976).

Le métabolisme myocardique des acides aminés et des protéines est également modifié par un trouble de l'oxygénation cellulaire. Pendant une anoxie du myocarde, la synthèse protéique est inhibée et le taux intracellulaire d'acides aminés a tendance à augmenter (JEFFERSON et al. 1971; PETERSON et LESCH 1975). Parallèlement aux effets de l'anoxie sur la synthèseprotéique cardiaque, KAO et al. (1976) ont démontré l'existence d'une réduction de la dégradation protéolytique pendant une ischémie sévère du myocarde, alors que l'activité des enzymes lysozomaux diminue. L'inhibition de la protéolyse, en association avec la déplétion des composés riches en énergie est en accord avec le fait que la protéolyse nécessite de l'énergie (TAKALA et al. 1980). Au niveau du muscle cardiaque, la privation d'oxygène entraîne une augmentation "in vivo" d'alanine par le biais d'une activation de l'enzyme alanine amino transférase et d'une déplétion de la concentration cellulaire de glutamate (TAEGTMEYER et al. 1977; LECLERC et al. 1978; FREMINET et al. 1980). L'alanine pourrait être un produit final du métabolisme cardiaque en anaérobie. Une telle adaptation métabolique ferait intervenir des précurseurs de l'alanine (aspartate et glutamate) pour favoriser la formation de composés énergétiques dans la mitochondrie (TAEGTMEYER et al. 1977), ou pour induire un couplage avec le métabolisme lipidique (HOCHACHKA et al. 1977).

I-C.2 - Oxygène et énergétique cellulaire.

Le métabolisme énergétique cardiaque inclut tous les procéssus impliqués dans la production et l'utilisation de l'adénosine triphosphate. Cette principale source d'énergie cellulaire est assurée par trois processus : la phosphorylation oxydative mitochondriale (BING 1965; OPIE 1969; SWYNGHEDAUW 1972; LA NOUE et SCHOOLWERTH 1979; WILLIAMSON 1979) et la phosphorylation de l'ADP par la créatine phospho kinase.

La phosphorylation oxydative qui représente près de 90 % de la production totale d'ATP dans le myocarde, a une activité étroitement couplée à l'utilisation d'oxygène. Cette source énergétique se localise dans la mitochondrie où la consommation d'oxygène représente 80 à 90 % de la consommation cellulaire d'oxygène.
La respiration mitochondriale et la respiration cellulaire sont fonction de l'activité métabolique et énergétique des différentes fractions cellulaires (ALTSCHULD et BRIERLEY 1977; WILSON et al. 1974, 1979, a, b). Au niveau de l'organe entier, il existe également une interdépendance entre la consommation d'oxygène et l'état énergétique du myocarde (PELOSI et al. 1969).

Depuis quelques années, des travaux théoriques et expérimentaux ont été entrepris pour tenter de définir les principes de la régulation du métabolisme énergétique, en fonction de l'état d'oxygénation des cellules cardiaques (SHRAGO et al. 1976; WILSON et al. 1974, 1977, 1979; NISHIKI et al. 1978; GIESEN et KAMMERMEIER 1980; VARY et al. 1981).
Dans la chaîne respiratoire mitochondriale, l'utilisation d'oxygène et la production d'ATP peuvent être stochiométriquement couplées. Dans ces conditions, les processus de phosphorylation oxydative sont tels, que le degré de respiration cellulaire représente, à un facteur près, la quantité d'énergie produite dans la cellule sous forme d'adénosine triphosphate. Au cours de la phosphorylation oxydative mitochondriale, les coenzymes réduits

(NADH , FADH) sont oxydés.

Les deux premiers sites de la phosphorylation oxydative sont équivalents à une réaction réversible au cours de laquelle l'oxydation d'une molécule de coenzyme mitochondrial ($NADH_m$) permet la phosphorylation de deux molécules d'ADP cytoplasmique (ADP_c) en ATP (réaction 1).

$$(1)\quad NADH_m + 2\ Cyt_m^{3+} + 2ADP_c + 2\ Pi_c \rightleftharpoons NAD_m^+ + 2ATP_c + 2\ Cyt_m^{2+}$$

Dans les conditions normales d'oxygénation, cette réaction est à l'équilibre (CLARK 1956; WILSON et al. 1974). La constante d'équilibre est définie par la relation suivante :

$$(2)\quad Keq = \left[\frac{NAD^+}{NADH}\right] \cdot \left[\frac{Cyt^{2+}}{Cyt^{3+}}\right]^2 \cdot \left[\frac{ATP}{ADP.Pi}\right]^2$$

Le troisième site de phosphorylation oxydative correspond à une réaction irréversible (ERECINSKA et al. 1978) au cours de laquelle l'oxygène devient le dernier accepteur d'électrons provenant de transferts successifs sur des complexes de cytochromes. Une molécule d'ATP est synthétisée au niveau de ce troisième site de phosphorylation (réaction 3).

$$(3)\quad 2Cyt_m^{2+} + 1/2\ O_2 + 2H^+ + 1\ ADP_c + 1\ Pi_c \longrightarrow 2\ Cyt_m^{3+} + H_2O + 1\ ATP_c$$

En bilan, l'oxydation complète d'une molécule de NADH fournit trois molécules d'ATP à la cellule (réaction 4).

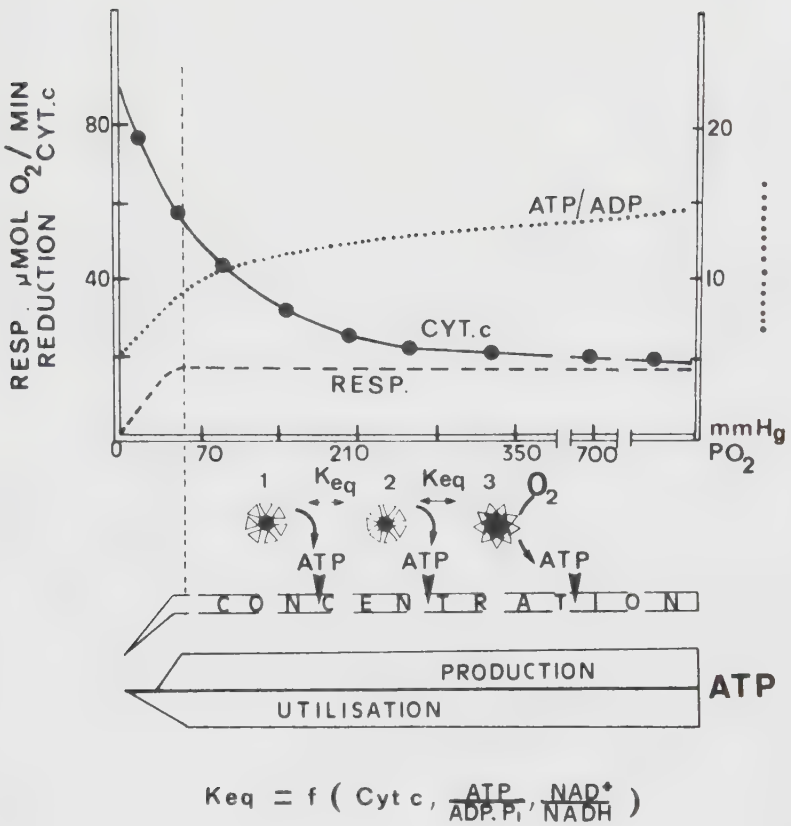
$$(4)\quad 3\ ADP_c + 1\ NADH_m + 1/2\ O_2 \longrightarrow 3\ ATP_c + 1\ NAD_m^+$$

La régulation de la respiration cellulaire se situe, pour l'essentiel, au niveau de la réaction irréversible de la phosphorylation oxydative. La vitesse de réaction de ce troisième site dépend de la quantité d'oxygène disponible et de l'état d'oxydo-

réduction des cytochromes. Le pourcentage de réduction des cytochromes est défini à partir de l'expression de la constante d'équilibre K_{eq}. Le taux de cytochrome réduit est fonction du rapport mitochondrial $NAD^+/NADH$ et du rapport cytoplasmique $\frac{ATP}{ADP.P_i}$ encore appelé potentiel phosphate cytoplasmique.
Les travaux de WILSON et al. (1979) ont montré que l'activité respiratoire des mitochondries dépend de la concentration d'oxygène dans la cellule, du rapport $NAD^+/NADH$ et du potentiel phosphate cytoplasmique. La respiration mitochondriale est activée par une diminution du potentiel phosphate ou du rapport $NAD^+/NADH$. Cette situation s'observe lorsque le métabolisme intermédiaire est accéléré et qu'apparaît une augmentation de la production de NADH et de la concentration cytoplasmique d'ADP libre.

Pour un niveau d'oxygénation cellulaire donné, la stabilité temporelle de la concentration cellulaire d'ATP est liée au fait qu'à tout instant le taux de production d'ATP équilibre le taux d'utilisation de ce composé. Parallèlement, la stabilisation du potentiel phosphate se reporte sur la stabilité de la consommation d'oxygène et sur l'activité de la phosphorylation oxydative (figure 6). La valeur de la PO_2 cellulaire pour laquelle le métabolisme énergétique subit des modifications profondes, peut être assimilée à la valeur de la PO_2, critique définie par certains auteurs (WILSON et al. 1979 a, b).

Pour des valeurs de PO_2 cellulaire inférieures à la PO_2 critique, le taux de synthèse d'ATP n'équilibre plus le taux d'utilisation de ce composé. Il en résulte l'apparition d'un déficit énergétique dû à un déséquilibre des deux premiers sites de phosphorylation de l'adénosine diphosphate (figure6). Dans ces conditions, le troisième site devient fortement dépendant de la quantité d'oxygène disponible et la vitesse de réaction du troisième site diminue (WILSON et al. 1979 a, b).
Pour des PO_2 cellulaires supérieures à la PO_2 critique, le degré de respiration cellulaire peut être maintenu constant si les



$$Keq = f\left(Cyt\,c, \frac{ATP}{ADP.P_i}, \frac{NAD^+}{NADH}\right)$$

FIGURE 6

Représentation schématique de la dépendance de la phosphorylation oxydative mitochondriale vis à vis de la PO_2 tissulaire.

deux premiers sites de phosphorylation de l'ADP sont équilibrés par l'ajustement des paramètres de la constante d'équilibre Keq. Le rapport mitochondrial NAD^+/NADH et le potentiel phosphate cytoplasmique évoluent de manière opposée au taux de cytochrome C réduit. La vitesse de réaction du troisième site de phosphorylation est maintenue constante à cause de l'évolution opposée de la PO_2 cellulaire et du taux de cytochrome C réduit (figure 6). Pour de fortes concentrations cellulaires d'oxygène, l'activité de la phosphorylation oxydative mitochondriale dépend en grande partie de la concentration en cytochrome C oxydase (ERECINSKA et al. 1978; WILSON et al. 1977; HOLLIAN et al. 1977).

Bien que l'ATP soit la source d'énergie nécessaire aux différentes fonctions mécaniques et chimiques du muscle cardiaque, la phosphocréatine (CP) reste la réserve d'énergie immédiatement disponible pour alimenter le réservoir d'ATP (CAIN et DAVIES 1962; CAIN et al. 1962). Bien que le concept de compartimentalisation de l'énergie cellulaire décrit par CARLSON et SIGER (1960) reste controversé, il existe un cycle énergétique intracellulaire comprenant les sites de phosphorylation oxydative, le transport d'ATP à travers les membranes mitochondriales et les sites actifs d'utilisation de l'ATP. Certains enzymes jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique des cellules : l'adénylate kinase (NODA 1973; VIAL et al. 1978; FONT et GAUTHERON 1980) et la créatine kinase. Au sein de la cellule cardiaque, cette enzyme, localisée dans le cytoplasme et l'espace intermembranaire mitochondrial , exerce un contrôle sur le cycle énergétique par l'intermédiaire de la réaction de LOHMAN (GUDBJARNASON et al. 1970; SAKS et al. 1974). En agissant sur cette enzyme, le taux intracellulaire de créatine exercerait un contrôle sur la production cellulaire de créatine phosphate (SERAYDARIAN 1976).

Lorsque les deux premiers sites de la phosphorylation oxydative sont en équilibre, les principes de la thermodynamique montrent que la somme des changements d'énergie libre des réactions

couplées approche O. Ceci implique que dans les mitochondries, l'énergie libre d'hydrolyse de l'ATP (Δ_G ATP) doit être égale, mais de signe opposé au changement d'énergie libre des réactions d'oxydo-réduction : ($-nF\Delta E$) = (Δ_G, Ox-Red)

$$\Delta_G \text{ ATP} + \Delta_G \text{, ox-réd.} = o$$

- la réaction de phosphorylation des deux premiers sites s'écrit :

$$2 \text{ ADP} + 2 P_i \rightleftharpoons 2 \text{ ATP}$$

avec $$\Delta_G \text{ ATP} = \Delta_{G^\circ} + RT \text{ Log} \left[\frac{\text{ATP}}{\text{ADP} . P_i} \right]$$

- la réaction d'oxydo-réduction des deux premiers sites s'écrit :

$$NADH + H^+ + 2 C^{3+} \rightleftharpoons NAD^+ + 2C^{2+} + 2H^+$$

avec $$\Delta_G \text{, ox-réd.} = nF \Delta E = nF(E_{NAD+} - E_{CytC^{3+}})$$

A pH 7.4 et 37° C, l'équation donnant Δ_G ATP peut s'écrire :

$$- \Delta_G \text{ ATP} = 7.6 + 1.42 \log \left[\frac{\text{ATP}}{\text{ADP} . P_i} \right]$$

L'utilisation d'oxygène au niveau de la phosphorylation oxydative mitochondriale correspond donc à une synthèse d'ATP et représente une source d'énergie libre modulée par le potentiel phosphate cytoplasmique $\left[\frac{\text{ATP}}{\text{ADP} . P_i} \right]$. Le rôle particulier du potentiel phosphate dans la régulation du métabolisme énergétique cardiaque doit être clarifié, car il pourrait être l'équivalent d'un signal cellulaire sensible à toute variation de l'état d'oxygénation des cellules.

CHAPITRE II

CONDITIONS EXPERIMENTALES.

II-A. PREPARATION DE L'ANIMAL

Les animaux utilisés sont des rats de souche Wistar, dont le poids est compris entre 300 et 350 grammes. Le rat est anesthésié à l'éther. Une injection d'héparine (0,1 ml, 100 ui) est effectuée dans la veine fémorale, deux minutes avant l'ouverture d'un volet thoracique. Le coeur est excisé rapidement, puis plongé dans une solution électrolytique pH 7.4 à 4°C pour arrêter toute activité contractile.

II-B. PROTOCOLE DE PERFUSION

II-B.1 - Canulations.

Une première canulation du segment aortique permet de placer le muscle cardiaque en perfusion rétrograde selon la technique de LANGENDORFF (1895), pour une période de préstabilisation de 15 minutes. Au cours de cette période, les veines pulmonaires sont canulées et l'artère pulmonaire est incisée pour draîner le sinus veineux coronaire.

II-B.2 - Circuit de perfusion.

* Principe.

La préparation de coeur isolé travaillant que nous utilisons, est obtenue à partir d'un appareillage de perfusion mis au point dans le laboratoire de biophysique, Hôpital Fernard WIDAL (MARTIN 1979). Ce système de perfusion est basé sur le principe initial décrit par NEELY et al. (1967), mais il élimine toute interface perfusat-gaz (Figure 7). D'autre part, cette préparation permet la régulation des pressions gauches : la pression moyenne dans l'oreillette gauche (POG) en précharge est réglable entre O et 15 cm d'eau avec une précision de l'ordre de 5 mm d'eau; la pression aortique moyenne (PAM) ou post-charge est fixée à 1m d'eau avec une précision de ± 2 cm d'eau. Les asservissements de la précharge et de la post-charge sont effectués par deux capteurs de déplacement (8,6) solidaires d'un piston de seringue (1,3). La régulation des pressions implique l'asservissement des valeurs h1 et h2 (Figure 7). Ceci est réalisé par les chaines de régulation qui comprennent un capteur de déplacement, une électronique de contrôle (4,5) et une pompe (9,11). Ainsi toute modification de la valeur h1 ou h2 est mesurée par le capteur de déplacement qui fournit, après démodulation de son signal d'excitation, une tension électrique proportionnelle à la valeur du déplacement. Cette tension est amplifiée dans 4 ou 5 qui réalisent un contrôle de la vitesse de rotation des pompes P1 ou P2, afin de ramener le piston à sa valeur initiale.
Ce système, par principe même des asservissements, permet la mesure en continu des débits coronaires (Qcor) et aortiques (Qao) sans utilisation de capteurs de débit, grâce aux dynamos tachymétriques. L'ensemble des régulations permet d'observer des adaptations de débits avec une constante de temps 1 seconde.

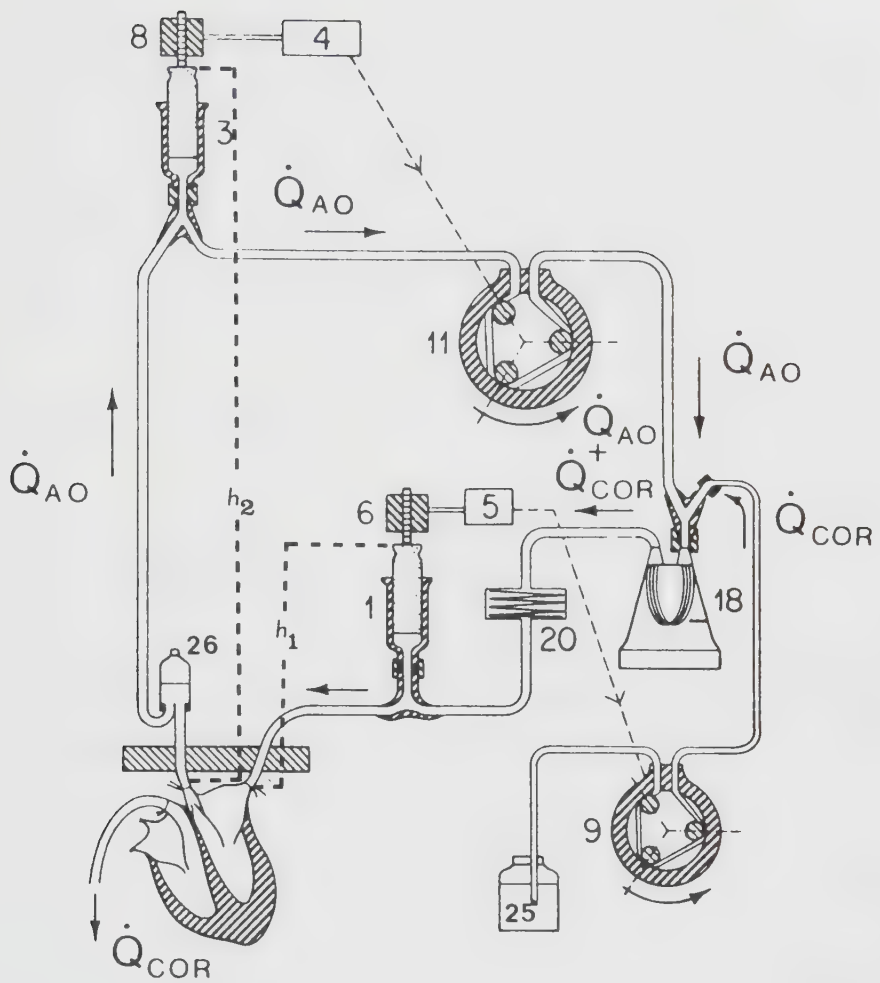


FIGURE 7

Circuit de perfusion utilisé pour la préparation de coeur isolé et travaillant.
(Les numéros sont définis dans le texte).

* Caractéristiques du circuit.

- Volume total de remplissage : 60 ml
- seringues en verre, type CORNWALL
- pompes MASTERFLEX, "Cole Parmer Instrument Co"
- oxygénateur (ox) "Membrane Oxygénator TRAVENOL, 5MO 321" ayant un volume de remplissage de 150 ml
- capteurs de déplacement type SENSLINE de LN INDUSTRIES
- dynamos tachymétriques type BIROTAX
- précisions des débits : débit coronaire : 0-30 ml/mn avec précision de ± 2 % pendant 8 heures
  : débit aortique : 0-200 ml/mn avec précision de ± 5 % pendant 8 heures

II-B.3 - Milieux de perfusion.

Les milieux de perfusion utilisés dans ce circuit sont des solutions électrolytiques ou des sangs reconstitués à partir de culots globulaires.

* Mise au point d'un sang reconstitué.

A partir de prélèvements de sang de porc, les globules rouges sont séparés du plasma par centrifugations successives à 900 g. La séparation des globules rouges des autres éléments figurés (plaquettes, globules blancs) est poursuivie dans des solutions électrolytiques isotoniques aux globules rouges par centrifugations à 900 g et à 20° C. Avant usage, les culots globulaires sont conservés à 4° C dans un milieu ionique contenant également du glucose (5 m M) et de la streptomycine.

Le sang est reconstitué par la mise en suspension d'un culot de globules rouges dans une solution électrolytique tamponée, préalablement filtrée sur Millipore 0,45µ .

La solution électrolytique est un KREBS-HENSELEIT modifié, p 7.4. Le sang ainsi obtenu est soigneusement passé sur un filtre SWANK IL 200, 10µ , avant d'être utilisé dans le circuit de perfusion. La composition finale du plasma, après reconsitution du sang est résumée dans la table suivante :

NaCl	: 118 mM	Albumine bovine (fraction V)	: 10 g/l
KCl	: 5,9 mM	Glucose	: 11 mM
Calcium libre (Ca ++)	: 2,5 mM		
$Mg\ SO_4$	: 0,5 mM	Pyruvate	: 1,2 mM
$Na\ H_2\ PO_4$	: 1,2 mM	Lactate	: 0,9 mM
$Na\ H\ CO_3$	: 28 mM	Osmolarité : 320 mosmoles	

Le sang est utilisé en ajustant l'hématocrite à 35 %.

A l'intérieur du circuit de perfusion, l'oxygénation du sang est assurée par un oxygénateur à membrane TRAVENOL, dans lequel circule le mélange gazeux : O_2 (20%), N_2 (74%), CO_2 (6%).

Avant toute perfusion, la réserve de sang (25) est oxygénée en circuit fermé afin d'équilibrer parfaitement les échanges entre sang et oxygénateur. Les pressions partielles d'oxygène et de CO_2 (PO_2 et PCO_2) ainsi que le pH sont contrôlés sur un radiomètre PHM 72 équipé d'une électrode à pH et d'électrode à membrane. Le contenu en oxygène du sang est mesuré sur une cellule galvanique Lex-O-Con (Lexington Instrument Corporation).

* Solution électrolytique.

Les solutions électrolytiques dépourvues de globules rouges (hématocrite 0%) sont des solutions tamponnées type KREBS-HENSELEIT. La composition est donnée dans la table suivante :

NaCl	: 118 mM	Albumine bovine (fraction V)	: 10 g/l
KCl	: 5,9 mM	Glucose	: 11 mM
Calcium libre (Ca++)	: 2,5 mM		
$Mg\ SO_4$	: 0,5 mM	Lactate	: 0,9 mM
$Na\ H_2\ PO_4$	: 1,18 mM	Pyruvate	: 1,2 mM
$Na\ H\ CO_3$	: 27 mM	Osmolarité : 320 mosmoles	

Cette solution est également filtrée avant utilisation.
L'oxygénation est assurée par un oxygénateur à membrane type TRAVENOL, gazé par le mélange O_2 (94%), CO_2 (6%).

II-C. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

La mise en évidence du rôle de la concentration artérielle en oxygène du perfusat dans la régulation de la fonction cardiaque est effectuée en utilisant deux perfusats de contenu artériel en oxygène très différents.
La figure 8, montre les points expérimentaux utilisés :

- Un sang à hématocrite 35% est utilisé avec une PO_2 artérielle de 135 mmHg. Le contenu artériel correspondant est mesuré à 15.3 ml O_2/100 ml.

- Cette concentration artérielle en oxygène peut-être réduite à 1.75 ml O_2/100 ml lorsque le perfusat utilisé est une solution électrolytique (hématocrite 0%) ayant une PO_2 artérielle de 600 mm Hg.

Ainsi, le changement de la capacité de transport en oxygène du perfusat est effectué sous la forme d'une permutation en échelon rectangulaire. La perturbation rapide de cette variable d'entrée est réalisée par un système automatique de permutation à double circuit auriculaire utilisant des vannes électro-pneumatiques (figure 9).

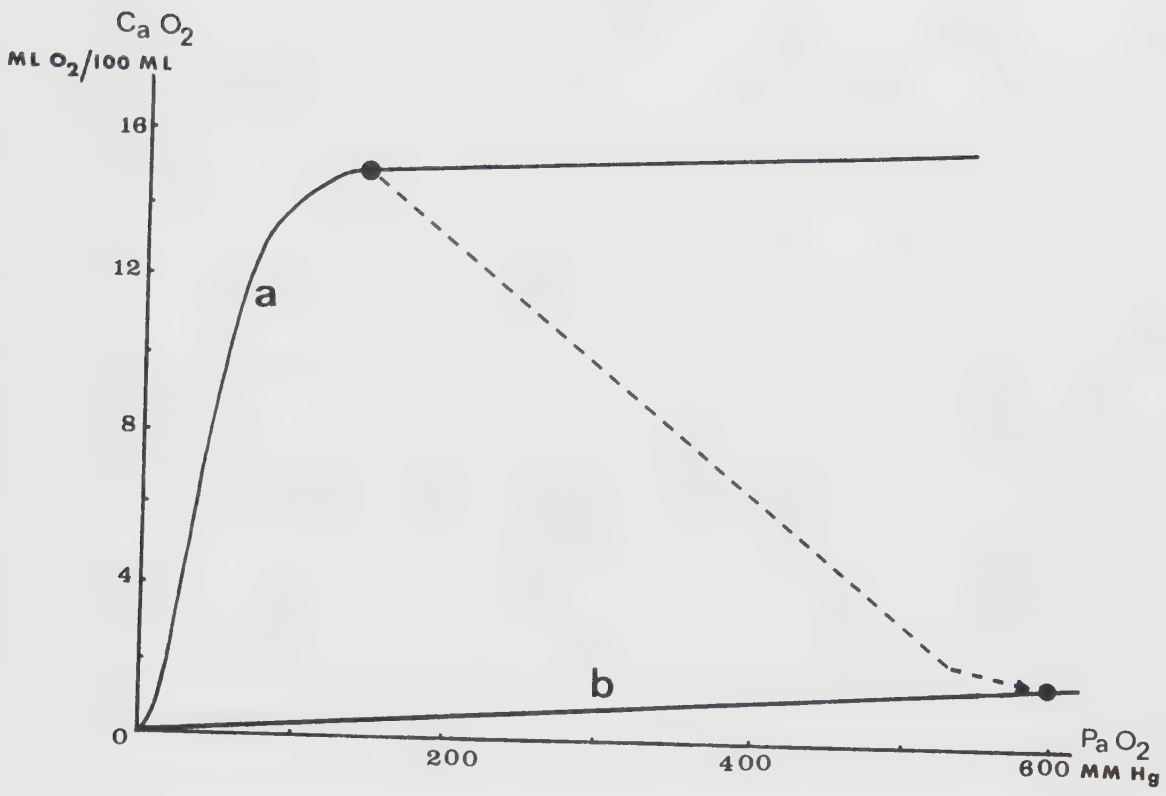


FIGURE 8

Représentation de la perturbation dans le plan de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (hématocrite 35%).

a. Courbe de dissociation
b. Relation contenu-pression pour une solution électrolytique.

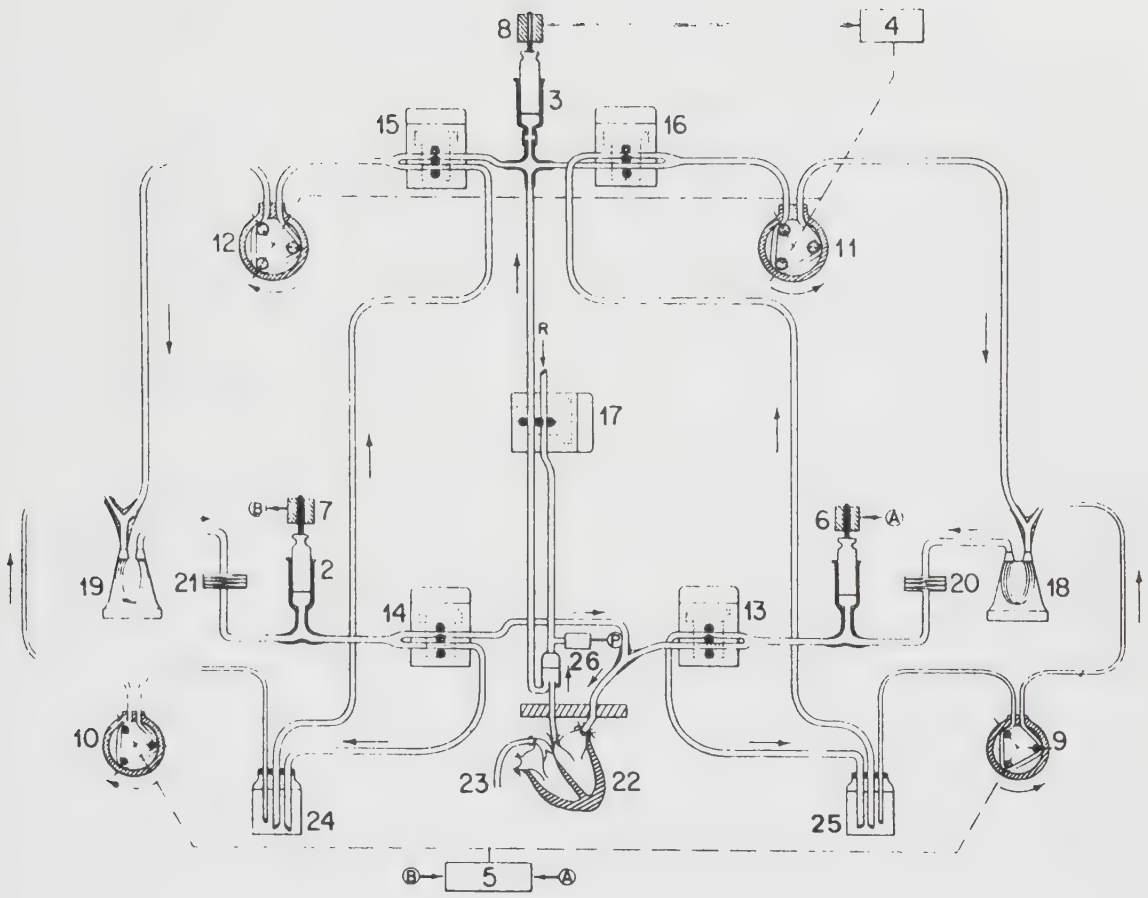


FIGURE 9

Double circuit auriculaire pour une préparation de coeur isolé travaillant.

13,14,15,16 : électrovannes ; 20,21: filtres

24,25 :réserves de perfusat ; 26: chambre d'éjection.

Les autres sigles sont définis dans le texte.

Ce double circuit auriculaire est symétrique par rapport au circuit aortique. Il comporte deux pompes coronaires couplées (11,12). L'utilisation de ces quatre pompes permet d'avoir un circuit d'attente dont le débit est strictement identique à celui du circuit actif. Cette symétrie entre les deux circuits est nécessaire pour éliminer tout artefact lors de la permutation. Afin d'éliminer toute contamination entre les deux circuits au moment de la permutation, un décalage est prévu dans le temps d'ouverture et de fermeture des diverses électrovannes. Ce décalage est calculé en fonction des débits instantanés dans les circuits aortiques et coronaires.

La séquence complète de permutation est fonction du type d'expérience : cette séquence est programmée sur ordinateur HP 21 MX. L'ordinateur pilote en temps réel l'ensemble de l'expérience et réalise une acquisition des différents paramètres qui sont stockés sur disque pour être ensuite traités. Il en résulte des courbes moyennes, normées en fonction du temps des différents paramètres. La vitesse d'échantillonnage peut être modifiée par programme. Nous avons choisi 3 secondes pour l'échantillonnage des débits, ce qui est suffisant, compte tenu de la bande passante du système.

Dans cette étude, nous avons réalisé un type de permutation dans l'apport d'oxygène au myocarde, en variant la concentration artérielle en oxygène du milieu de perfusion.

Dans toutes les expériences, le coeur est placé dans les mêmes conditions initiales : une période de stabilisation de 45 minutes avec une perfusion de sang. La perfusion peut être poursuivie dans les mêmes conditions (+ 15 minutes) ou être modifiée par le changement de circuit lors d'une première permutation (+ 15 minutes). Le retour aux conditions initiales est assuré par une seconde permutation sur le circuit d'origine (+ 10 minutes).

Le décours expérimental est le suivant :

STABILISATION 45 minutes (+ 15 minutes)	PERMUTATION 1 DIMINUTION CAO_2 (+ 15 minutes)	PERMUTATION 2 RECUPERATION (+ 10 minutes)
Sang hématocrite 35 %	Solution électrolytique Hématocrite 0%	Sang hématocrite 35 %
33...37°C--- 37°C	----------	----------→
PaO2 : 135 ± 3 (mmHg)	600 ± 15	136 ± 2
CAO_2 : 15.3 ± 0.2 (ml O_2/100 ml)	1.75 ± 0.05	15.3 ± 0.4
$PaCO_2$: 37 ± 3 (mmHg)	35 ± 1	37 ± 2
pHa : 7.38 ± 0.008	7.40 ± 0.02	7.40 ± 003

II-D. ECHANTILLONAGES ET TECHNIQUES DE DOSAGE.

Les modifications métaboliques du muscle cardiaque liées à la perturbation de la concentration artérielle en oxygène du perfusat sont étudiées à partir d'échantillons artériels et veineux de perfusat et sur des échantillons tissulaires.

II-D.1 - Protocoles de prélèvements.

La figure 10 résume le protocole des prélèvements. Les prélèvements artériels sont effectués au niveau de la canule des veines pulmonaires et les prélèvements veineux au niveau du

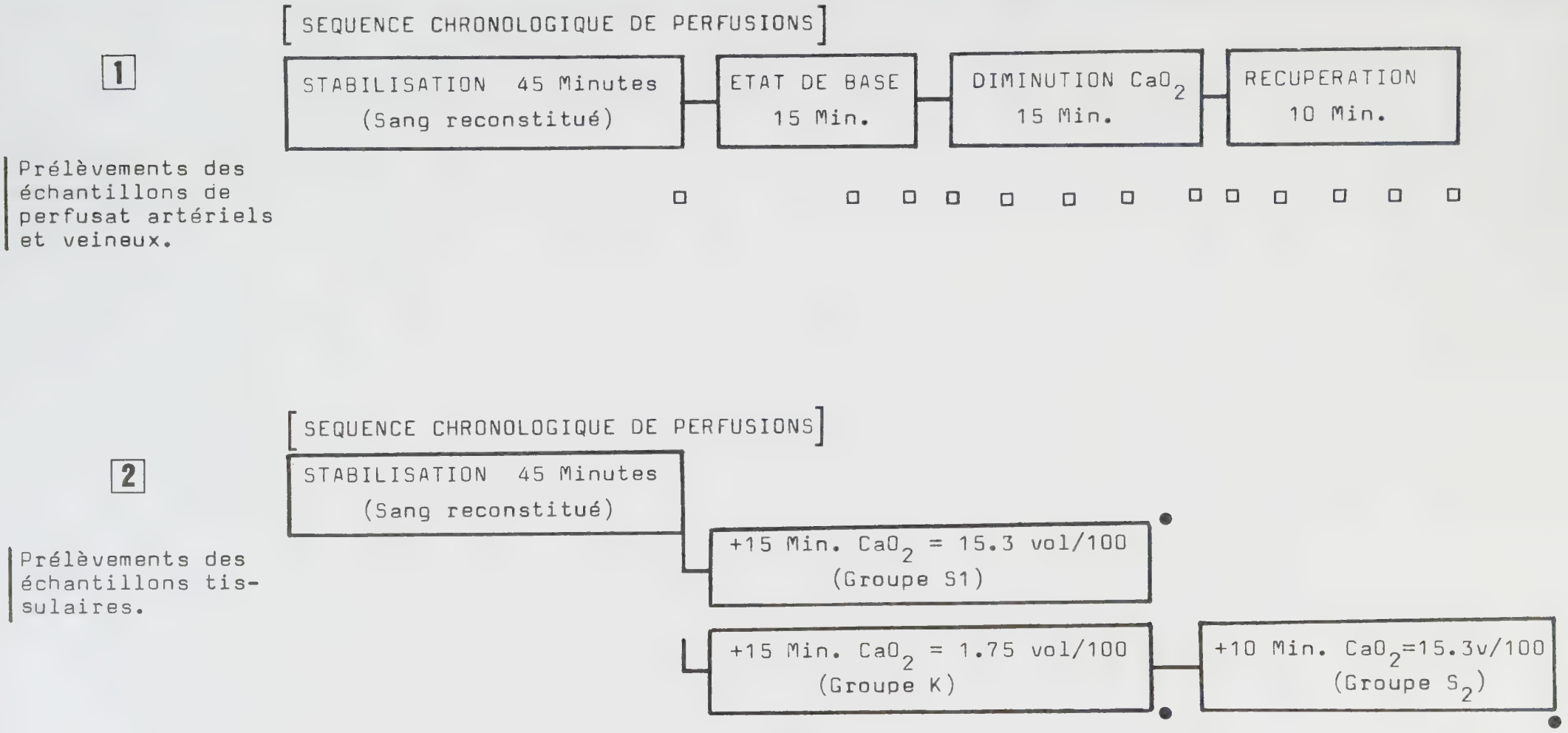


FIGURE 10

Protocole de prélèvements des échantillons de perfusat et de tissu.

cathéter localisé dans le sinus veineux coronaire (23, figure 9).

Les échantillons tissulaires sont prélevés à la fin d'une séquence de perfusion. Une double série expérimentale a été nécessaire car certains échantillons sont prélevés à des états intermédiaires du décours expérimental. Les masses ventriculaires sont congelées afin de figer le plus rapidement possible le métabolisme tissulaire. La vitesse de congélation étant inversement proportionnelle au carré de l'épaisseur de l'échantillon (WOLLENBERGER et al. 1960), il est nécessaire de rendre l'échantillon le plus mince possible afin d'obtenir une vitesse de congélation optimale. La technique de congélation utilisée est celle de WOLLENBERGER et al. (1960). Le tissu cardiaque est écrasé par une pince munie de 2 blocs de duralumin de conductivité thermique à 20°C égale à 0.29-0.41 µth.cm/cm.S.°C. Ces blocs sont préalablement refroidis dans de l'azote liquide (-196°C). La galette tissulaire obtenue (1 mm d'épaisseur) est séparée de l'appareil de perfusion et immédiatement plongée dans l'azote liquide jusqu'à la période des dosages propremendits. Le diagramme du protocole de prélèvements des échantillons tissulaires est représenté dans la figure 10. Trois groupes expérimentaux sont ainsi définis : S_1, K, S_2.

II-D.2 - Analyses des échantillons de perfusat.

Les échantillons de perfusat sont immédiatement traités selon le protocole résumé dans la figure 11.
Le dosage de glucose, lactate et pyruvate sont effectués par semi-microméthodes enzymatiques :

Glucose : Méthode à l'héxo kinase, dérivée de la technique de SCHMIDT (1961).
Volume de la cuve : 1.06 ml, volume de l'échantillon traité : 0.05 ml.

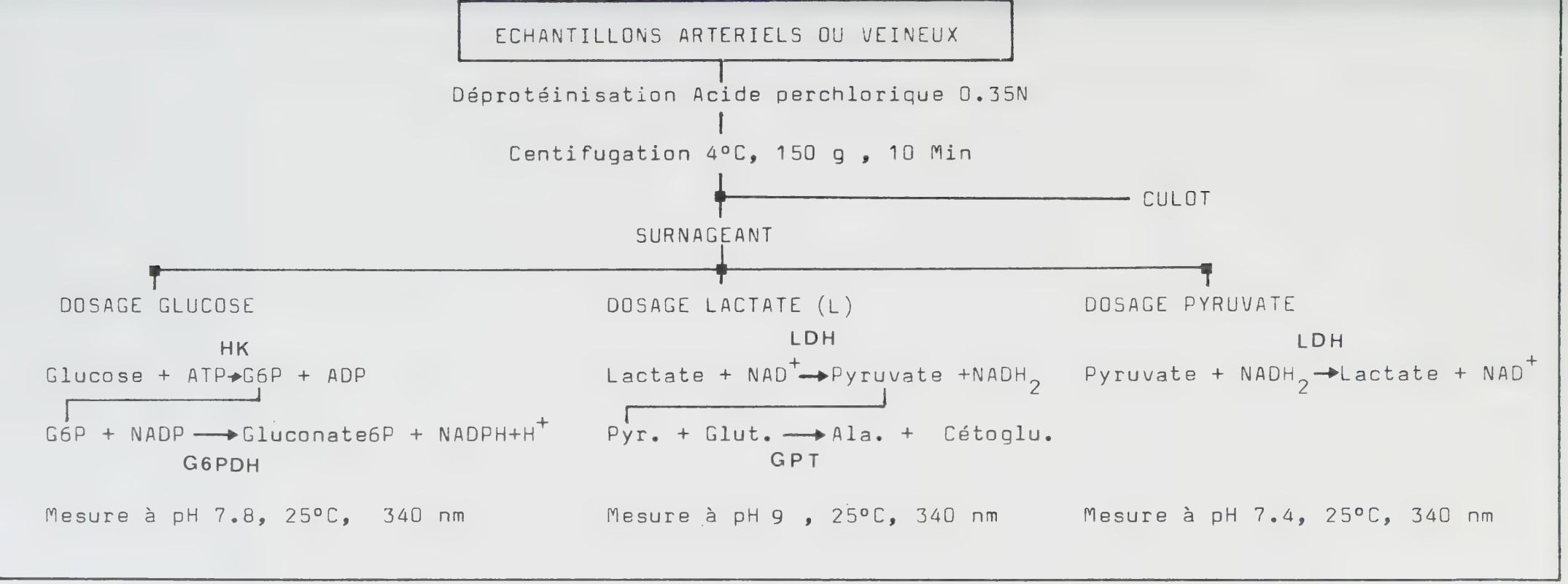


FIGURE 11

Protocoles de dosages dans les échantillons de perfusat (artériel ou veineux).

Lactate : Méthode de GUTMANN et al. (1974).
Volume de la cuve : 1.12 ml, volume de l'échantillon traité : 0.05 ml.

Pyruvate : Méthode de CZOK et al.(1974).
Volume de la cuve : 1.22 ml, volume de l'échantillon traité : 0.5 ml.

Toutes les mesures sont effectuées à 25°C sur un spectrophotomètre PERKIN-ELMER 551 double faisceaux, équipé de cuvettes thermostatées.

* Principe de calcul des flux de captation.

Les flux de captation de glucose, lactate et pyruvate sont calculés à partir d'une loi de FICK et exprimés en µMoles/min/g.

Flux de captation = $(C_{PL}A - C_{PL}V) \cdot (1\text{-hématocrite}) \cdot Q\ COR$

$C_{PL}A$ = Concentration artérielle plasmatique (µM/ml)

$C_{PL}V$ = Concentration veineuse plasmatique (µM/ml)

Les concentrations en glucose, lactate, pyruvate de chaque échantillon sont mesurées à partir des densités optiques mesurées avant et après réaction enzymatique. La variation de densité optique correspond à l'apparition ou à la disparition d'un coenzyme (NADH ou NADPH) à une longueur d'onde déterminée. Pour chaque échantillon un blanc est effectué.
La loi de BEER-LAMBERT permet de relier les variations de densité optique aux concentrations correspondantes d'un composé à

$$\Delta E = \xi \cdot \Delta C \cdot 1$$

$$\Delta C = \frac{\Delta E \cdot 1}{\xi \cdot 1}$$

La variation de densité optique d'un blanc ou d'un échantillon (dE ou dE') est obtenue en retranchant à la valeur de la densité optique au plateau (fin de dosage, E_2) celle du début de dosage (E_1).

Pour le blanc : $dE = E_2 - E_1$

Pour l'échantillon : $dE' = E'_2 - E'_1$

La variation de densité optique ΔE, dûe à la seule présence du composé à doser est définie par la relation

$$\Delta E = dE' - dE$$

Les concentrations artérielles et veineuses des substrats de chaque échantillon sont calculées par la formule :

$$C\ (\ \mu M/ml) = \frac{V}{v \cdot l \cdot \xi} \cdot \Delta E \cdot F$$

V = volume final de la cuve

v = volume de l'échantillon traité

l = trajet optique de la cuve

ξ = coefficient d'extinction moléculaire du composé apparu ou disparu (coenzyme)

F = facteur de délection dû aux différents traitements.

II-D.3 - Analyses des échantillons tissulaires.

Les extractions tissulaires sont effectuées à la température de l'azote liquide jusqu'à la période de précipitation protéique. Les différentes phases d'extraction sont présentées dans la figure 12. Les centrifugations sont opérées à 4°C sur une centrifugeuse SORVALL Super Speed RC 5.

Les dosages des différents métabolites sont effectués sur les fractions de surnageantsdéprotéinisés :

Glycogène : Dosage enzymatique selon la technique de GOOD al. (1933). Hydrolyse acide à 100°C. Lecture à 334 mm.

Glucose 1 P : Dosage enzymatique selon la technique de BERGMEYER et MICHAL (1974). Lecture à 334 mm.

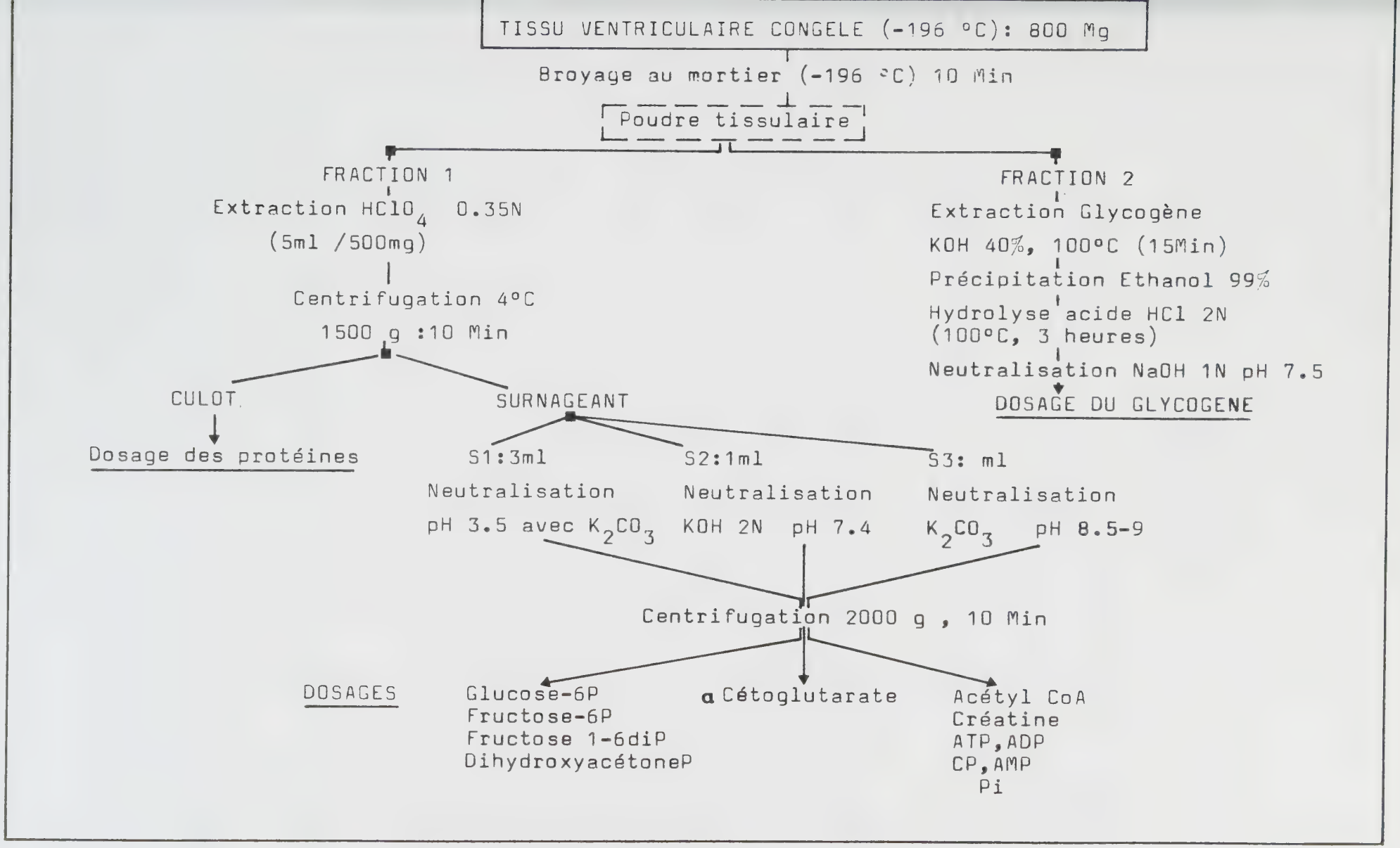


FIGURE 12

Protocoles de dosages dans les échantillons tissulaires.

Glucose 6 p : Dosage enzymatique selon la technique de LANG et MICHAL (1974).
Lecture à 334 mm.

Fructose 1-6 di P et di-hydroxyacétone-P : Dosage enzymatique de MICHAL et BEUTLER (1974).
Lecture à 334 mm.

Acétyl CoA : Dosage enzymatique de DEKER (1974)
Lecture à 334 mm.

α- Cétoglutarate : Dosage enzymatique de BERGMEYER et BERNT (1974).
Lecture à 340 mm.

Lactate, Pyruvate : Voir techniques du paragraphe II-D.2.

ATP et CP : Méthode de LAMPRECHT et TRAUTSHOLD et LAMPRECHT et STEIN (1974).

ADP et AMP : Méthode enzymatique de JAWORECK et al. (1974).

Créatine : Méthode de BERNT et al. (1974).

Phosphates inorganiques : Méthode colorimétrique de GAWEHN (1974).

Toutes les mesures sont effectuées sur un spectrophotomètre double faisceaux PERKIN-ELMER 551 à 25°C.

Les principes de mesures de concentrations tissulaires sont identiques à ceux décrits dans le paragraphe II-2. Les concentrations tissulaires sont exprimées en nMoles/mg de protéine ou en µM/g de poids frais. Les protéines sont dosées dans les culots de centrifugation selon une technique faisant intervenir la réaction

du biuret : GORNALL et al. (1949). En présence d'ions cuivriques et en milieu alcalin, les protéines développent un complexe bleu-violet dont l'intensité mesurée à 540 nm est proportionnelle à la concentration en protéine. Les concentrations sont calculées à partir d'une courbe étalon.
Les solutions utilisées pour l'ensemble des dosages biochimiques sont préparées à partir de produits ultra purs (BOEHRINGER - MANNHEIM, SIGMA) et d'eau distillée apyrogène. Les solutions sont refaites pour chaque période de dosages.

II-E. ANALYSES STATISTIQUES.

Dans certaines séries expérimentales, la comparaison de deux moyennes a été effectuée.
Pour des échantillons de petites tailles, le test "t" Student est utilisé en calculant l'estimation commune des variances de deux populations à comparer :

$$S^2 = \frac{\sum (Sx - mA^2) + \sum (Sx - mB)^2}{(n_A + n_B - 2)}$$

et en formant l'expression :

$$(t) = \frac{mA - mB}{\sqrt{\frac{S^2}{nA} + \frac{S^2}{nB}}}$$

mA = Moyenne de la population A
mB = Moyenne de la population B
nA = Nombre d'échantillons de la population A
nB = Nombre d'échantillons de la population B

Lorsque les moyennes des deux populations (A et B) ne sont pas statistiquement différentes ($mA \simeq mB$), l'expression de (t) est distribuée selon la loi de "t" à $(n_A + nB - 2)$ degrés de liberté. La table de "t" donne la probabilité pour que "t" égale ou dépasse, en valeur absolue, une valeur donnée en fonction du nombre de degrés de liberté. Nous prendrons comme limite de signification $P < 0.05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

III-A. RESULTATS HEMODYNAMIQUES.

III-A.1 - Analyse en transitoire.

L'originalité du système de perfusion que nous avons utilisé repose sur le fait que deux circuits rigoureusement identiques peuvent fonctionner en alternance. L'un des circuits est en attente par rapport à l'autre et la commutation en échelon des deux circuits est commandée par un ordinateur qui assure également l'acquisition de données en temps réel.

Toutes les mesures hémodynamiques et métaboliques ont été effectuées sur des coeurs préalablement soumis à une période de stabilisation de 45 minutes. Au cours de cette période, la température générale du circuit est progressivement amenée de 33 à 37 $\pm$ 0.3°C.

La stabilisation des débits aortiques et coronaires d'un coeur perfusé avec un sang ayant un hématocrite de 35 %, une CaO_2 de 15.3 ml O_2/100 ml et une PaO_2 de 135 mm Hg est représentée Figure 13 A. La stabilité peut être maintenue pendant 3 à 4 heures (figure 13 B).

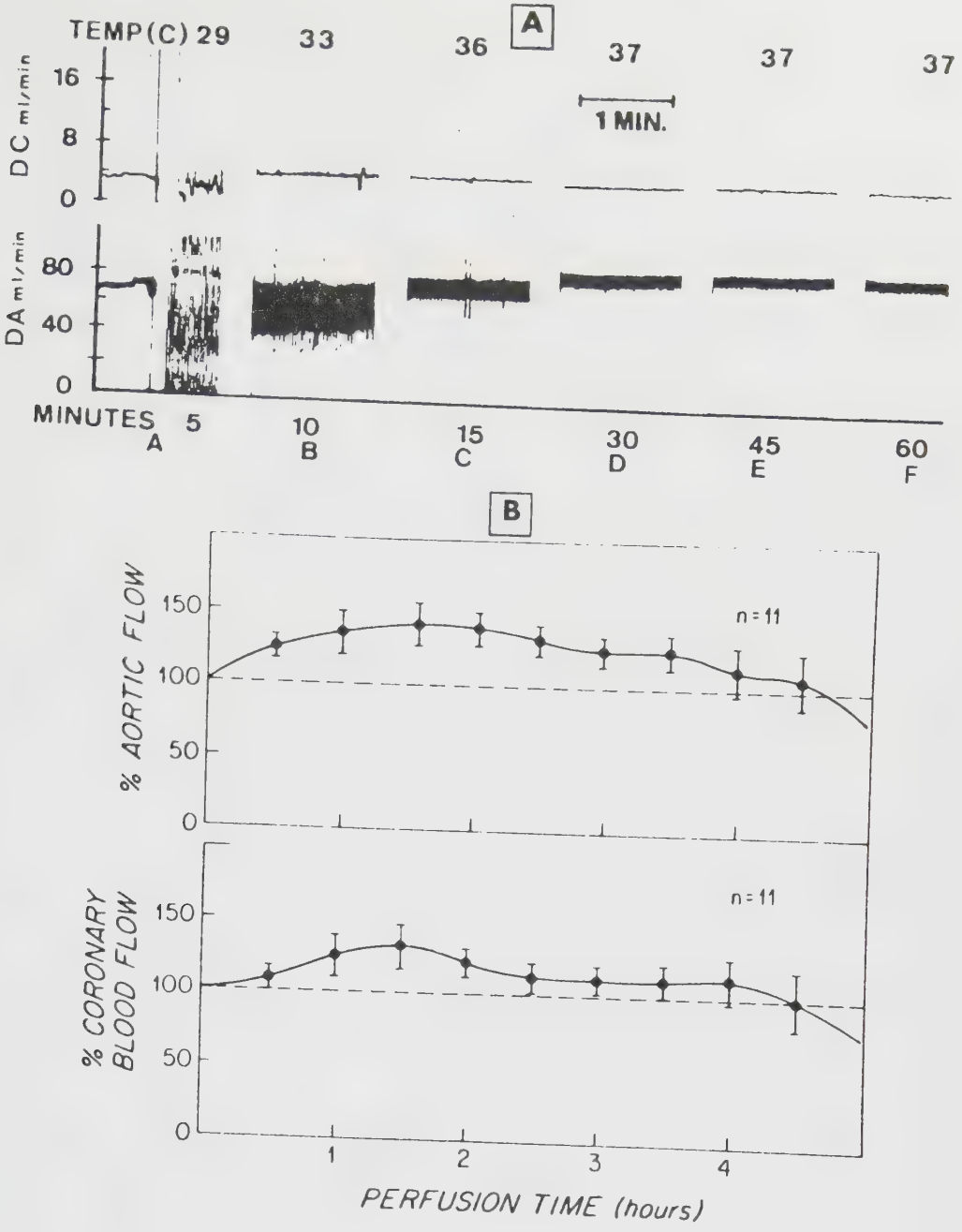


FIGURE 13

A. Evolution des débits coronaire (DC) et aortique (DA) au cours de la période de stabilisation.

B. Courbes de stabilité des débits durant une perfusion de 5 heures avec un sang reconstitué (hématocrite 35%) La température de perfusion est de 37°C.

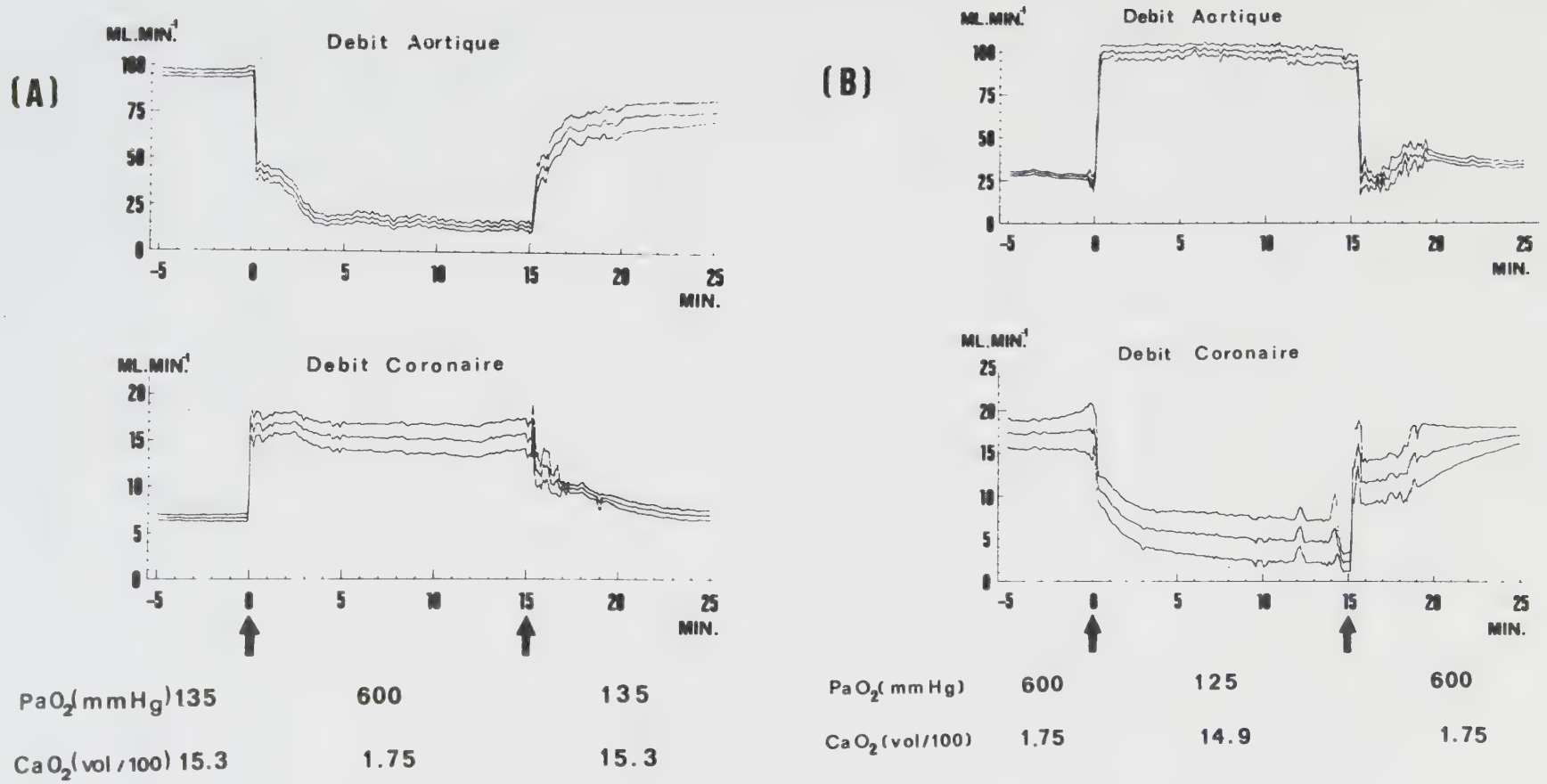


FIGURE 14

Adaptations des débits coronaire et aortique à une variation de la concentration artérielle en oxygène (CaO_2).
Pour chacune des réponses, l'intervalle de confiance est représenté.
A. Coeurs d'abord perfusés avec une CaO_2 physiologique (n=23).
B. Coeurs d'abord perfusés avec une CaO_2 faible (n=5).

Lorsque le contenu artériel en oxygène du perfusat est subitement abaissé de 15.3 à 1.75 ml/O_2/100 ml avec une diminution simultanée de l'hématocrite de 35 à 0%, un nouvel état hémodynamique apparait en 10 à 15 secondes. (figure 14 A). Le débit aortique chute brusquement de 350% alors que le débit coronaire augmente dans le même temps de 150%. Après 15 minutes de perfusion avec une solution dépourvue de globules rouges, une nouvelle permutation des perfusats avec un retour au circuit initial (sang à hématocrite 35% et CaO_2 15.3 ml O_2/100 ml) entraîne une récupération partielle du débit aortique (75% de sa valeur initiale) et du débit coronaire (90% de sa valeur initiale).

Une inversion du protocole expérimental (figure 14 B) entraîne l'apparition de réponses inversées.

III-A.2 - Performances cardiaques en régime stationnaire.

* Débits et pressions.

Les mesures de débits et pressions effectuées sur les coeurs perfusés en régime stationnaire sont regroupés dans le tableau 1.

Après 60 minutes de perfusion du muscle cardiaque avec un sang à hématocrite 35%, le débit coronaire représente 5 à 6% du débit cardiaque total (débit aortique + débit coronaire). Ce pourcentage passe à 42% lorsque le contenu artériel en oxygène du perfusat passe de 15.3 à 1.75 ml O_2/100 ml et que l'hématocrite tombe de 35% à 0%.

Les pressions enregistrées au niveau de la chambre d'éjection sont également modifiées par un changement de la CaO_2 du perfusat.

La diminution de la CaO_2 entraîne un pincement des pressions systoliques et diastoliques et une diminution de la pression aortique moyenne.

Les perturbations de débits et pressions observées sur le coeur perfusé avec une faible CaO_2 sont réversibles puisque un retour à

une perfusion avec une CaO_2 physiologique entraîne une récupération satisfaisante des débits et pressions.

* Travail externe, consommation d'oxygène, rendement.

Le travail externe du ventricule gauche a été calculé par la formule suivante :

W externe = gradient pression .Débit cardiaque . α

Le gradient de pression est égal à la différence entre la pression aortique moyenne et la pression moyenne de remplissage de l'oreillette gauche. Le coéfficient α ($1.33\ 10^{-4}$) permet d'exprimer le travail interne en joule/minute.

Le rendement est défini par le rapport travail externe/équivalent énergétique de MVO_2 (MVO_2.20,9). La consommation myocardique d'oxygène est calculée par l'équation de convection circulatoire de FICK (Chapitre I, I-B.2). Les résultats sont regroupés dans le tableau 1.

Ces trois paramètres sont significativement modifiés par un changement de la CaO_2 du milieu de perfusion. La consommation d'oxygène diminue de 50% lorsque cette CaO_2 passe de 15.3 à 1.75 ml O2/ 100 ml. Parallèlement, le travail externe diminue de 65% et le rendement est significativement abaissé. Une reperfusion avec un sang à CaO_2 physiologique entraîne une récupération partielle de ces variables.

* Fréquence cardiaque.

Les coeurs isolés battent spontanément. La fréquence cardiaque n'est pas significativement modifiée par un changement de la CaO_2 du milieu de perfusion : 356 $\pm$ 8 battements/min. (Hte 35% et CaO_2 15.3 ml O_2/100 ml) et 325 $\pm$ 10 battements/min(Hte 0% et CaO_2 1.75 ml O_2/100 ml).
Cependant, les troubles du rythme sont d'autant plus fréquents que l'hématocrite est faible. La figure 15 montre l'effet de l'hématocrite sur l'apparition de ces troubles du rythme.

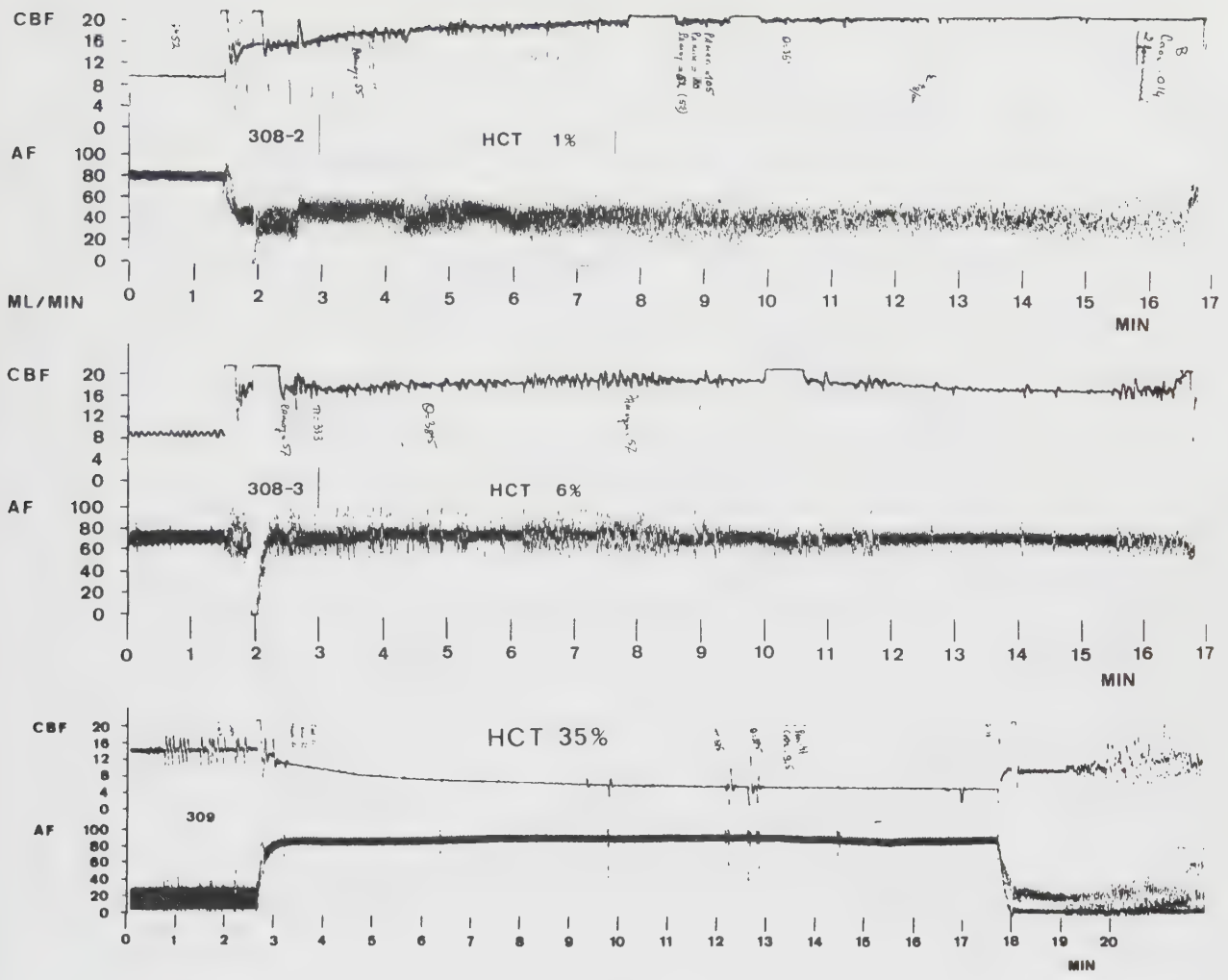


FIGURE 15

Effet de l'hématocrite sur les troubles du rythme de coeurs perfusés , non stimulés. Les troubles sont particulièrement visibles au niveau de l'enregistrement du débit aortique .

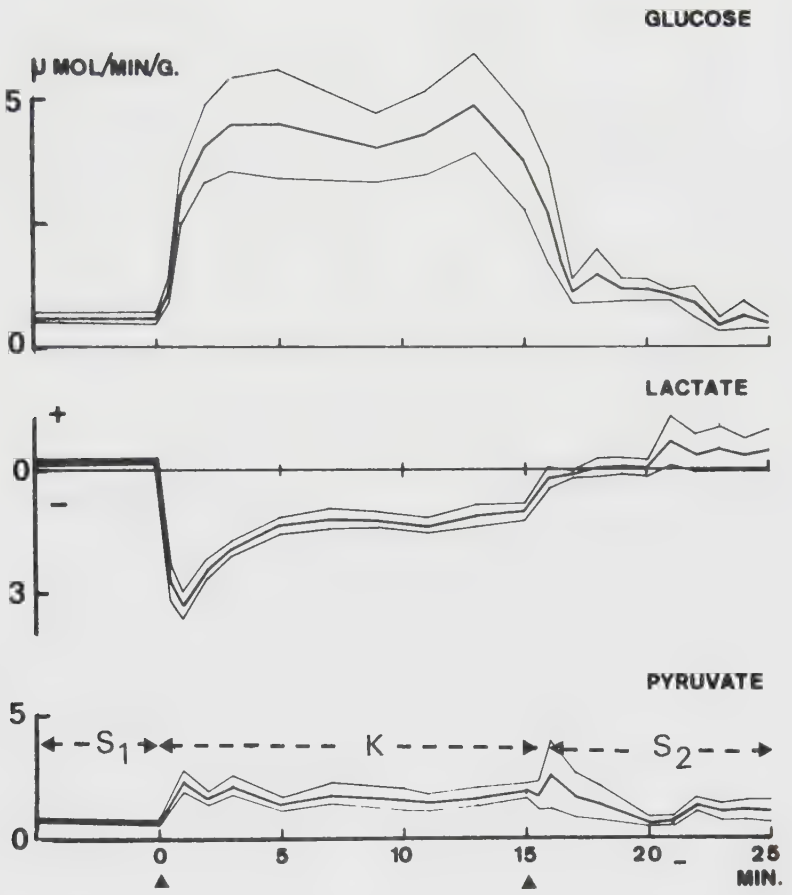


FIGURE 16

Flux de captation de glucose, lactate et pyruvate (n = 10).

+ = captation - = libération

TABLEAU 1.

PERFORMANCES HEMODYNAMIQUES DE COEURS PERFUSES.
CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 8 EXPERIENCES.

(2) VS (1) (3) VS (1) * $p < 0.05$ NS non significatif

CONDITIONS DE PERFUSION / PARAMETRES	PERFUSION SANG : 60 minutes (1)		PERFUSION SANG : 45 min. + PERFUSION KREBS: 15 min. (2)		PERFUSION SANG : 45 min. + PERFUSION KREBS: 15 min. + PERFUSION SANG : 10 min. (3)	
Débit coronaire (ml/min/g)	6.4 ± 0.5		15.1 ± 0.7	*	7.2 ± 0.7	NS
Débit aortique (ml/min/g)	91 ± 3		21.5 ± 2	*	75 ± 6	*
Pression systolique (mm Hg)	113 ±		77 ± 4	*	107 ± 5	NS
Pression diastolique (mm Hg)	28 ± 1		34 ± 2	*	22 ± 4	NS
Pression aortique moyenne (mm Hg)	82 ± 1		61 ± 1	*	70 ± 2	*
Fréquence (battements/min.)	356 ± 8		330 ± 10	*	361 ± 16	NS
Débit d'éjection systolique (ml/bat/g)	0.275 ± 0.012		0.117 ± 0.005	*	0.230 ± 0.009	*
Débit coronaire/Débit cardiaque (%)	6.5 ± 0.07		40.8 ± 0.9	*	8.6 ± 0.3	NS
Travail cardiaque externe (J/min./g)	0.840 ± 0.035		0.285 ± 0.015	*	0.575 ± 0.030	*
Consommation d'oxygène ($ml/O_2/min/g$)	0.348 ± 0.03		0.160 ± 0.010	*	0.280 ± 0.025	*
Rendement (%)	12 ± 0.6		8.2 ± 0.40	*	10.6 ± 0.50	NS

III-B. ACTIVITE METABOLIQUE DU MYOCARDE.

III-B.1 - Utilisation des substrats exogènes.

Les flux de captation de glucose, lactate et pyruvate, sont dépendant de l'état d'oxygénation du muscle cardiaque.

La figure 16 montre l'évolution de ces flux lorsque le myocarde est alternativement perfusé avec du sang, une solution électrolytique et de nouveau du sang.

La diminution de la CaO_2 du milieu de perfusion entraîne une augmentation significative de la captation de glucose et de pyruvate par le muscle cardiaque. Alors que le coeur perfusé avec du sang, a une légère tendance à capter du lactate. Ce comportement s'inverse en allant dans le sens d'une production de lactate, lorsque le sang est remplacé par une solution électrolytique. Une reperfusion avec le sang reconstitué permet d'atteindre un état proche de celui des conditions initiales.

III-B.2 - Activité glycolytique du myocarde.

Pour les différentes conditions de perfusion, les résultats des analyses tissulaires sont regroupés dans le tableau 2.

Le stock tissulaire de glycogène est très sensible aux conditions d'oxygénation. Il peut être défini comme une fonction croissante de la capacité de transport en oxygène du perfusat. Au cours d'une perfusion avec une basse CaO_2, l'appauvrissement du stock tissulaire de glycogène est associé à une augmentation de la concentration cellulaire en glucose 1-P, en fructose 1.6 di-P et à une diminution de la concentration en glucose 6-P.

Toute variation de CaO_2 entraîne également une modification du rapport lactate/pyruvate et des concentrations tissulaires des intermédiaires du cycle de KREBS : acétyl CoA et α-cétoglutarate.

TABLEAU 2.

CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE METABOLITES.

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 6 EXPERIENCES

EN DEHORS DU GLYCOGENE, LES CONCENTRATIONS SONT EXPRIMEES EN n.MOL/mg PROTEINE.

(2) VS (1) (3) VS (1) * $p < 0.05$ NS : non significatif.

CONDITIONS DE PERFUSION / CONCENTRATIONS	PERFUSION SANG : 60 min. (Groupe S_1) (1)		PERFUSION SANG : 45 min. + PERFUSION KREBS: 15 min. (Groupe K) (2)		REPERFUSION AVEC SANG (Groupe S_2) (3)	
Glycogène (µ Mol Eq.Gluc/g)	29.9 ± 2.9		11.5 ± 1.6	*	17.9 ± 1.5	*
Glucose-1 P	56.7 ± 5.6		89 ± 16	*	77 ± 4	*
Glucose-6 P	1.9 ± 0.15		1.2 ± 0.09	*	2.3 ± 0.2	NS
Fructose 1.6 di P	0.108 ± 0.02		0.222 ± 0.04	*	0.075 ± 0.010	NS
Dihydoxyacétone-P	0.106 ± 0.01		0.149 ± 0.03	NS	0.137 ± 0.05	NS
Pyruvate	1.6 ± 0.2		3.1 ± 0.3	*	2.7 ± 0.5	*
Lactate	21.8 ± 2.2		49.8 ± 3.6	*	24.1 ± 3	NS
Lactate/Pyruvate	10.7 ± 1.7		17.5 ± 3.1	*	9 ± 1.9	NS
Acétyl Co A	4.5 ± 0.5		1.5 ± 0.2	*	2.8 ± 0.4	*
α Cétoglutarate	2.2 ± 0.2		1.3 ± 0.1	*	2.2 ± 0.4	NS

Pour les coeurs perfusés avec du sang, les concentrations d'acétyl CoA et α-cétoglutarate sont associées à une faible valeur du rapport lactate/pyruvate. Cette situation métabolique est perturbée lorsque CaO_2 diminue : augmentation des concentrations en lactate, pyruvate avec accroissement du rapport lactate/pyruvate, diminution des concentrations en acétyl coenzyme A et α-cétoglutarate (tableau 2). Une reperfusion avec le sang reconstitué favorise une récupération partielle de stock tissulaire de glycogène, une normalisation du rapport lactate/pyruvate et des autres paramètres biochimiques.

III-B.3 - Métabolisme énergétique du myocarde.

Pour les trois groupes de coeurs expérimentés (S_1, K, S_2), les concentrations tissulaires des composés phosphorylés impliqués dans le métabolisme énergétique ont été déterminées.

Une modification de la concentration artérielle en oxygène entraîne une variation des concentrations tissulaires des composés riches en énergie (tableau 3). Une baisse de CaO_2 induit une diminution des réserves en ATP, ADP et créatine. Ces perturbations métaboliques sont réversibles à l'exception de la créatine qui reste faible, même après une reperfusion avec un sang à hématocrite 35% (groupe S_2). Les taux tissulaires d'AMP et de phosphate inorganique ont un comportement inverse des taux d'ATP et d'ADP. Il en résulte que le rapport ATP/AMP et la charge totale en énergie (ATP + 1/2 ADP/ Σ ANP) sont très dépendant des conditions d'oxygénation du muscle cardiaque. Ces paramètres énergétiques sont d'autant plus élevés que la qualité de l'oxygénation cardiaque est améliorée (groupe S_1 et S_2).

En revanche, dans nos conditions expérimentales, la concentration tissulaire de créatine phosphate est pratiquement insensible aux variations de la CaO_2 du perfusat (tableau 3).

TABLEAU 3.

CONCENTRATIONS TISSULAIRES DES COMPOSES RICHES EN ENERGIE.

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 6 EXPERIENCES.

LES CONCENTRATIONS SONT EXPRIMEES EN n.Mol/mg PROTEINE.

(2)VS (1) (3) VS (1) * $p < 0.05$ NS : non significatif

CONDITIONS DE PERFUSION / CONCENTRATIONS	PERFUSION SANG : 60 min. (Groupe S_1) (1)		PERFUSION SANG : 45 min. + PERFUSION KREBS: 15 min. (Groupe K) (2)		REPERFUSION AVEC SANG (Groupe S_2) (3)	
ATP	26.9 ± 1.2		14.2 ± 1	*	22.1 ± 3.1	NS
ADP	4.5 ± 0.3		5.01 ± 0.14	NS	4.91 ± 0.46	NS
AMP	0.93 ± 0.12		2.19 ± 0.25	*	1.37 ± 0.28	NS
Σ ANP	32.3 ± 1.3		21.3 ± 1.2	*	28.3 ± 3.2	NS
ATP/AMP	27 ± 0.9		7 ± 0.5	*	16.9 ± 1	*
$\frac{ATP + 1/2\ ADP}{\Sigma\ ANP}$	0.9 ± 0.05		0.78 ± 0.02	*	0.86 ± 0.05	NS
CP	38.9 ± 2.9		38.5 ± 4.6	NS	36.2 ± 4.2	NS
CREATINE	36.8 ± 3.7		24.2 ± 3.6	*	22.8 ± 0.1	*
Pi	29.8 ± 3.3		38.4 ± 2.8	*	30.2 ± 0.2	NS

Dans les cellules cardiaques, les différents adénines nucléotides phosphorylés peuvent être partiellement chélatés à des protéines (LA NOUE et al. 1962, KOHN et al. 1977), mais toute fraction libre présente dans le cytosol peut être déterminée à partir des équations de LOHMAN et de l'adénylate kinase (chapitre I). Les hypothèses envisagées pour la détermination de ces fractions libres, ainsi que les méthodes de calcul utilisées sont explicitées dans l'annexe .

Le tableau 4 regroupe les différentes données relatives aux concentrations cytosoliques d'adénines nucléotides non chélatées. Ces concentrations cytosoliques d'ATP, d'ADP et d'AMP sont influencées par les caractéristiques physiques du milieu de perfusion. Les concentrations d'ATP et d'ADP libres sont une fonction croissante de la CaO_2 artérielle. En revanche, la concentration cytosolique d'AMP libre augmente lorsque les conditions d'oxygénation du muscle cardiaque deviennent défavorables. Il en est de même du rapport ATP_F/ADP_F.

Le rapport $\frac{ATP_F}{ADP_F \; Pi_F}$ (potentiel phosphate cytoplasmique) a été choisi comme index de l'état de phosphorylation du cytosol. Ce potentiel phosphate est d'autant plus faible que la concentration artérielle en oxygène du perfusat est élevée (tableau 4). En conséquence, toute dimunution de CaO_2 entraîne une variation de l'état de phosphorylation du cytosol et un ralentissement de l'activité respiratoire des mitochondries. Au cours d'une perfusion du muscle cardiaque avec une solution dépourvue de globules rouges, l'état d'oxydo-réduction des cytochromes de la chaîne respiratoire mitochondriale est probablement modifié, puisque le changement d'énergie libre pour la synthèse d'ATP (Δ_G ATP) est différent de celui des coeurs perfusés avec du sang (tableau 4).

TABLEAU 4.

CONCENTRATIONS CYTOSOLIQUES D'ADENINES NUCLEOTIDES NON CHELATES
ET ETAT DE PHOSPHORYLATION DU CYTOSOL

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 6 EXPERIENCES

LES CONCENTRATIONS SONT EXPRIMEES EN n.Mol/Mg PROTEINE

(2) VS (1) (3) VS (1) * : $p < 0.05$ NS : non significatif.

CONDITIONS DE PERFUSION / CONCENTRATIONS ET PARAMETRES	PERFUSION SANG : 60 min. (Groupe S_1) (1)	PERFUSION SANG : 45 min. + PERFUSION KREBS: 15 min. (Groupe K) (2)		REPERFUSION AVEC SANG (Groupe S_2) (3)	
ATP_F	39.03 ± 1.57	20.6 ± 0.98	*	33.5 ± 1.02	NS
ADP_F	5.31 ± 0.11	1.55 ± 0.073	*	4.05 ± 0.10	*
AMP_F	0.248 ± 0.054	0.048 ± 0.002	*	0.169 ± 0.005	*
ATP_F/ADP_F	7.35 ± 0.20	13.3 ± 0.45	*	8.25 ± 0.50	*
$ATP_F/ADP_F.Pi_F$ (10^3 M^{-1})	1.05 ± 0.03	1.66 ± 0.07	*	1.15 ± 0.05	NS
Δ_G ATP (Kcal/2 ATP)	11.8 ± 0.02	12.2 ± 0.06	*	11.9 ± 0.01	NS

III-B.4 - Relations fonction cardiaque, activité métabolique.

Nous venons de voir que la capacité de transport en oxygène du milieu de perfusion intervient sur les performances hémodynamiques et l'activité métabolique du muscle cardiaque. Une étroite interdépendance des fonctions hémodynamiques et métaboliques du myocarde peut être dégagée de cette étude. Ainsi, pour les différentes conditions d'oxygénation du tissu cardiaque, le travail externe du ventricule gauche est corrélé avec les concentrations tissulaires de glycogène et d'ATP (figure 17).

Contrairement à la créatine phosphate, l'ATP, source d'énergie directement utilisable par le myocarde, est une fonction croissante de la quantité d'oxygène apportée au coeur isolé (figure 18 A). De plus, la fraction libre d'ATP cytosolique est plus importante dans les coeurs perfusés ayant une consommation d'oxygène élevée (figure 18 B). Lorsque cette consommation d'oxygène tend à être optimale (groupes S_1 et S_2), on retrouve une plus grande concentration d'ADP libre dans le cytosol et un potentiel phosphate plus bas (figure 19 A). En conséquence, toute détérioration de l'état d'oxygénation du myocarde entraîne une diminution de la réserve cytosolique d'ADP libre et une augmentation du potentiel phosphate cytosolique et de l'énergie libre Δ_G ATP (figure 19).

III-C DISCUSSION.

Une nouvelle préparation de coeur isolé et travaillant a été mise au point dans le laboratoire de biophysique et a été utilisée pour étudier les adaptations hémodynamiques et métaboliques du muscle cardiaque soumis à une perturbation rapide de la capacité de transport en oxygène du perfusat.

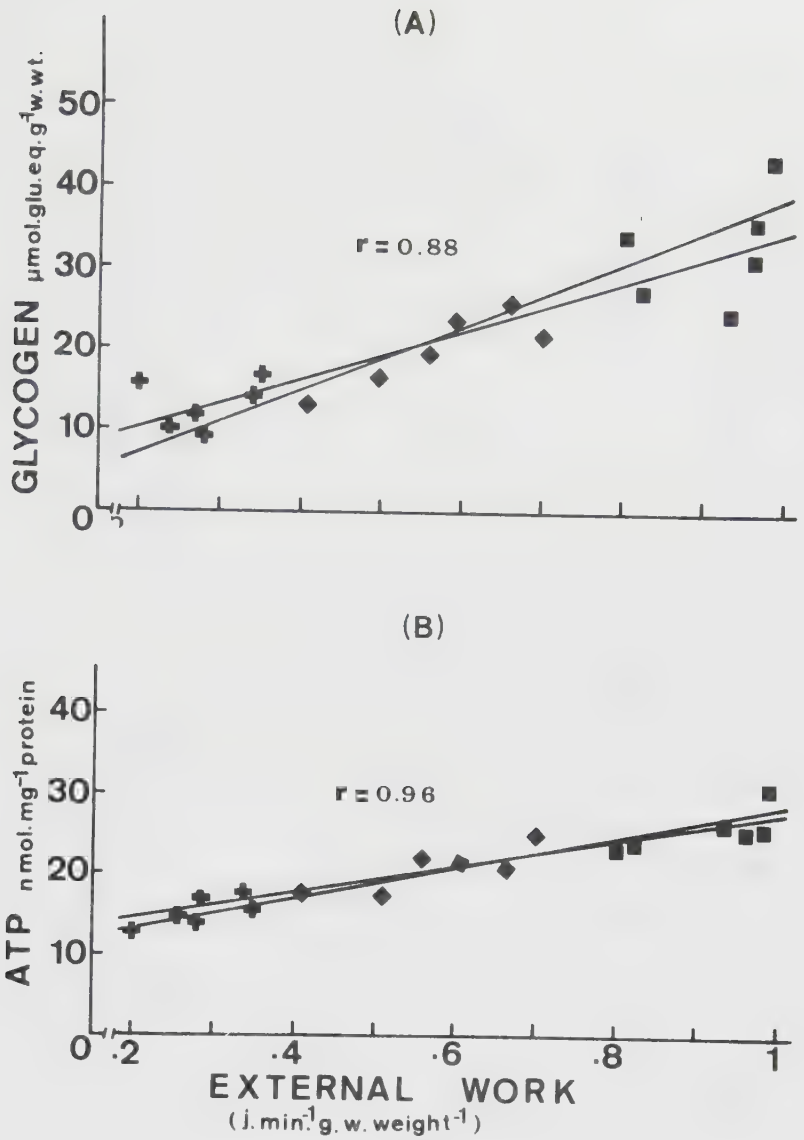


FIGURE 17

Régression linéaire de deuxième espèce entre le travail cardiaque externe et la concentration tissulaire de glycogène (A) ou entre le travail externe et le taux cellulaire d'ATP.

A. $X = 0.59 + 0.025\ (Y-22)$ $\quad Y = 22 + 30.3\ (X-0.59)$ $\quad r=0.88$

B. $X = 0.59 + 0.052\ (Y-20.7)$ $\quad Y = 20.7 + 18.02(X-0.59)$ $\quad r=0.96$

■ groupe S_1 ✚ groupe K ◆ groupe S_2

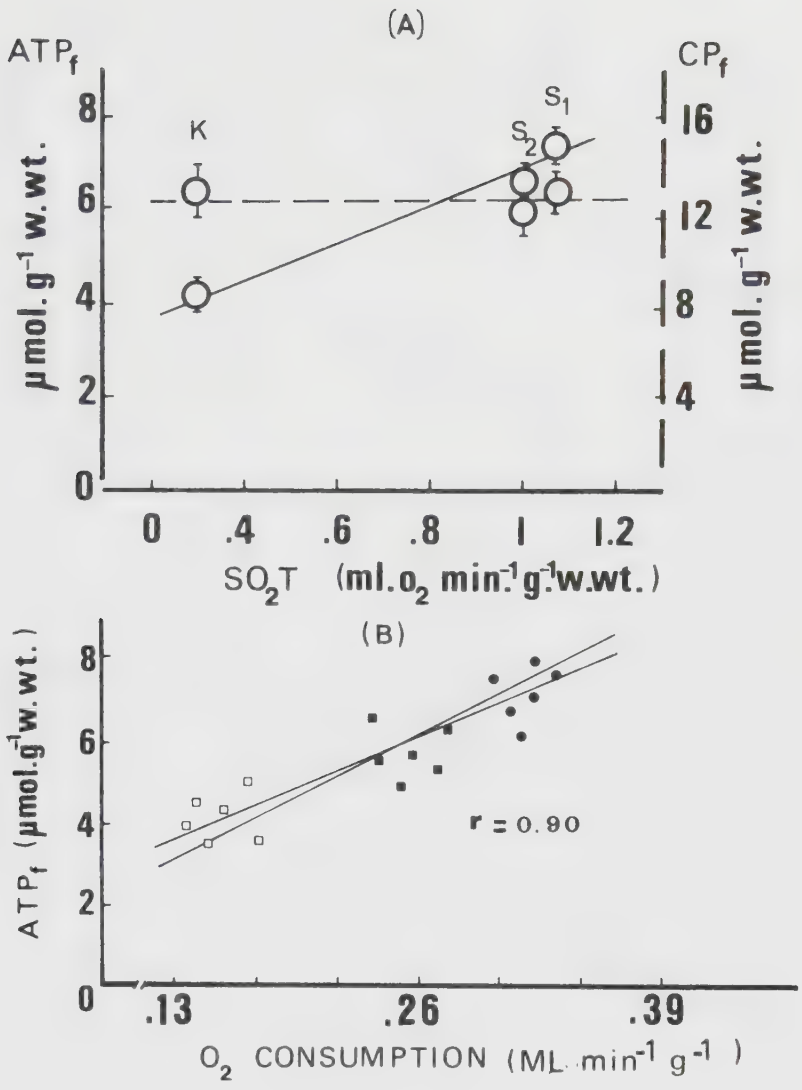


FIGURE 18

A. Influence de SO_2T sur les concentrations cytosoliques d'ATP et de CP non chélatés. Chaque point est la moyenne ± SEM de 6 coeurs.

B. Régression linéaire de seconde espèce entre la consommation d'oxygène et la concentration cytosolique d'ATP libre: X = 5.6 + 1.04(Y-5.68)

Y = 5.7 + 0.77(X-5.60)

● groupe S_1 □ groupe K ■ groupe S_2

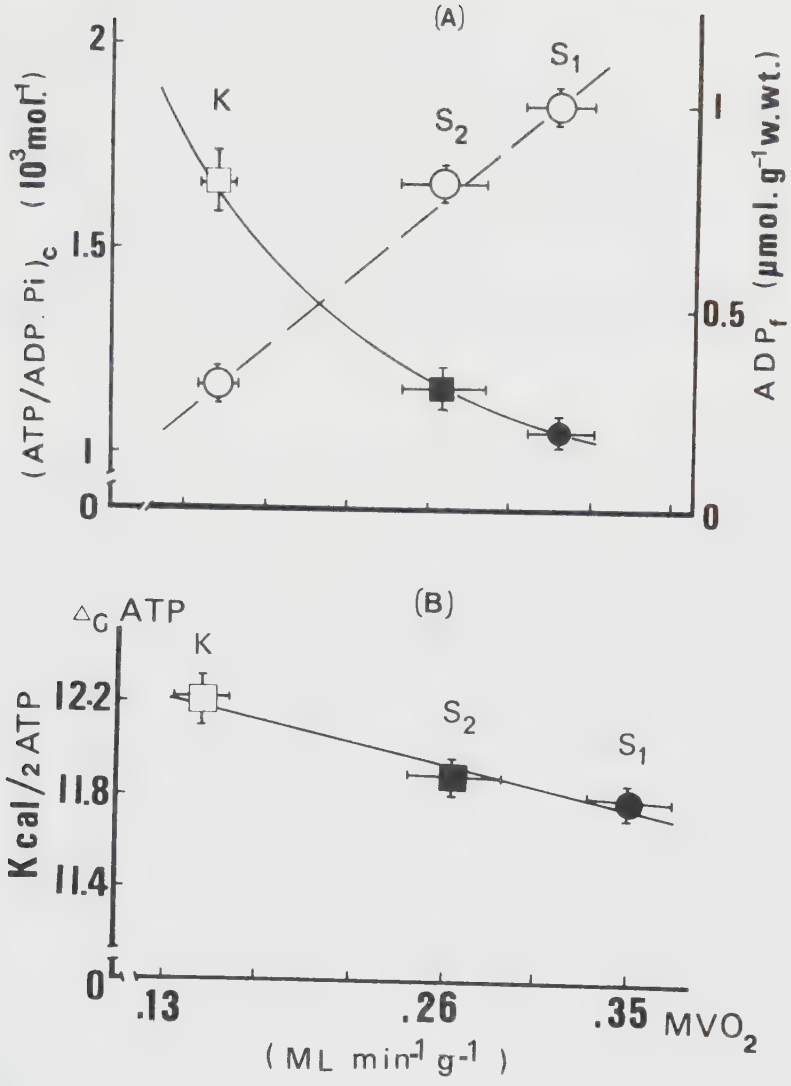


FIGURE 19

A. Relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel phosphate cytoplasmique (——) ou la concentration cytosolique d'ADP libre (— —).

B. Relation entre la consommation d'oxygène et le changement d'énergie libre pour la synthèse d'ATP (Δ_g ATP).

L'utilisation d'un double circuit a pour avantage de considérer chaque coeur comme son propre témoin.

L'une des originalités de cette technique de perfusion est que le travail cardiaque externe peut être contrôlé à partir d'une régulation de la précharge et de la post charge. D'autre part, le muscle cardiaque peut être soumis à des variations rapides, mais contrôlées, des propriétés physiochimiques du milieu de perfusion.

Cette préparation de coeur isolé et travaillant a été plus spécialement conçue pour utiliser des milieux de perfusion contenant des globules rouges en suspension. L'absence d'interface entre le milieu ambiant et le perfusat est une des caractéristiques de ce nouveau circuit. Cette absence d'interface semble essentielle pour préserver de manière efficace l'intégrité des globules rouges et limiter la dénaturation des protéines plasmatiques.

Avec une pression atriale (précharge) de 9 mm Hg, le débit cardiaque moyen d'un coeur perfusé avec un sang reconstitué (hématocrite 35%, PO_2 artérielle de 135 mm Hg) est comparable à celui mesuré par DOWELL et al. (1975) sur le coeur de rat "in situ". Les valeurs du débit coronaire et du volume d'éjection systolique (stroke Volume) ainsi que l'absence de troubes du rythme sont autant d'éléments caractéristiques d'une activité cardiaque physiologique.

Dans des conditions où le transport circulatoire de l'oxygène au tissu cardiaque est modifié(par une diminution de CaO_2, une augmentation de la PO_2 artérielle), le myocarde subit de profondes perturbations hémodynamiques. La fraction du débit cardiaque utilisée pour l'oxygénation du myocarde devient subphysiologique. La réponse quasi instantanée du débit coronaire à une baisse de CaO_2 peut être expliquée, en partie, par un changement de viscosité

du perfusat,engendrée par une baisse de l'hématocrite (CHIEN 1972, MESSMER et al. 1972). Cependant, l'importance d'une modification de la tonicité des vaisseaux n'est pas à exclure dans cette réponse coronaire, bien qu'elle soit difficile à définir qualitativement dans notre étude.

Avec une pression de remplissage atriale de 9 mm Hg, le débit cardiaque est comparable aux valeurs obtenues par DE LEIRIS et al. (1978), BUNGER et al. (1979). D'autre part, le volume d'éjection systolique du coeur perfusé avec une faible CaO_2 est identique à celui mesuré par NEELY et al. (1967 a), BUNGER et al. (1979) sur un modèle de coeur isolé travaillant perfusé avec des solutions électrolytiques.

Bien que la fréquence cardiaque ne soit pas un paramètre très sensible aux variations de CaO_2, notre étude montre que la fréquence des arythmies augmente lors des perfusions avec de basses CaO_2. Ces arythmies ventriculaires deviennent rares au delà de 10% d'hématocrite.

La quantité d'oxygène utilisable par le tissu cardiaque dépend du débit coronaire, du temps de contact du perfusat aux niveaux des sites d'échanges capillaires, de la densité capillaire et du gradient de pression en oxygène le long des capillaires (MARTINI et HONIG, 1969; DUVELLEROY et al. 1980, 1981). Nos résultats, en accord avec les travaux de BASSINGTHWAIGHTE (1974) et WITTENBERG (1970) montrent que la quantité d'oxygène utilisée par le muscle cardiaque est modulée par la capacité de transport en oxygène du perfusat. Les coeurs perfusés avec du sang reconstitué dont la CaO_2 est physiologique ont une consommation d'oxygène nettement supérieure à celle mesurée par d'autres auteurs sur le coeur isolé travaillant perfusé par une solution électrolytique (ROVETTO et al. 1973; NEELY et al. 1972 a, b) ou perfusé avec du sang reconstitué (BUNGER et al. 1979; TAEGTMEYER et al. 1980). En conséquence,

il n'est pas contradictoire d'observer une diminution de la consommation d'oxygène au cours d'une permutation sang-solution électrolytique. Lors d'une perfusion sans oxyhémoglobine, l'oxygène disponible pour le myocarde est représenté par la fraction solubilisée de sorte que le contenu artériel en oxygène reste faible même à forte PO_2 artérielle. Dans ces conditions, l'auto-régulation du débit coronaire, qui est dépendante des adaptations de la microcirculation (LOMBARDO et al. 1953; TRENOUTH et al. 1976), est insuffisante pour maintenir une consommation d'oxygène constante. Bien que dans notre étude la PO_2 du sinus veineux coronaire soit augmentée au cours de la perfusion à hématocrite 0% et bien que de nombreux auteurs considèrent la présence d'une PO_2 du sinus veineux coronaire élevée comme significative d'une oxygénation myocardique satisfaisante, il n'existe aucun argument pour valider cette considération; la consommation d'oxygène et la PO_2 du sinus veineux coronaire évoluent en sens inverse (DUVELLEROY et al. 1976), surtout en présence d'un shunt artério-veineux important. Il ne fait d'autre part aucun doute que la PO_2 du sinus veineux coronaire des coeurs isolés varie dans une large mesure avec le travail effectué (NEELY et al. 1967; GAMBLE et al. 1970; DUVELLEROY et al. 1976).

Cette étude hémodynamique a été associée à une investigation métabolique du tissu cardiaque. Ces résultats expérimentaux ont permis de définir l'interdépendance qui existe entre la fonction mécanique et l'activité métabolique du muscle cardiaque au cours d'une modification des propriétés physico-chimiques du milieu de perfusion. Pour les différentes conditions de perfusion aérobie, le travail cardiaque externe peut être relié au taux cellulaire de glycogène. Ce résultat est en accord avec les concepts de WILLIAMSON et al. (1976); BING et al. (1976) selon lesquels le glycogène est essentiel pour préserver l'activité mécanique des coeurs perfusés. Toute augmentation de la capacité de transport en oxygène du perfusat entraîne une préservation de la réserve tissulaire de glycogène et secondairement une meilleure capacité des fonctions cardiaques.

Au cours d'une perfusion avec une solution dépourvue de globules rouges, la déplétion du stock tissulaire de glycogène peut être analysée comme le résultat d'une accélération de la glycogénolyse à la suite d'une activation de la glycogène phosphorylase "b". La déplétion en glucose 6 phosphate et en ATP serait responsable de l'activation de la glycogène phosphorylase "b" (MORGAN et PARMEGGIANI 1964; OPIE et al. (1971 b); NEELY et al. 1970). Simultanément, l'augmentation de la concentration de F 1-6 di-phosphate dans les coeurs perfusés avec une CaO_2 faible, serait dûe à une activation de la phospho fructo kinase (MANSOUR 1963). Dans ces conditions, la baisse de l'hématocrite et CaO_2 peut être assimilée à une hypoxie partielle au cours de laquelle la captation de glucose est augmentée (OPIE 1968, 1969; NEELY et al. 1970, 1973) et la glycogénolyse et glycolyse accélérées (PARMEGGIANI et MORGAN 1962; CORNBLATH et al. 1963; OPIE 1971 a; KUBLER et SPIECKERMAN 1970).

La permutation sang-solution électrolytique entraîne l'apparition d'une excrétion de lactate par le myocarde. Qu'il y ait ou non ralentissement des autres métabolismes aérobies, cette production peut être interprétée comme une accélération de la glycolyse (KEUL et al. 1967; HATT et al. 1969).

L'activité du cycle de KREBS est également modulée par la qualité du liquide vecteur d'oxygène. Les concentrations cellulaires d'acétyl CoA et d' α-cétoglutarate sont d'autant plus importantes que les conditions d'oxygénation du myocarde sont optimales, c'est-à-dire lors d'une perfusion avec un hématocrite à 30-35% (MESSMER et al. 1972; DUVELLEROY et al. 1979 a).

Lorsque les conditions d'oxygénation du myocarde deviennent défavorables (par une baisse de l'hématocrite par exemple), l'activité du cycle de KREBS est ralentie et l'augmentation du rapport tissulaire lactate/pyruvate est essentiel pour favoriser la régénéra-

tion du NAD, maintenir le potentiel redox cytoplasmique et favoriser la production glycolytique d'ATP.

Au cours des différentes conditions d'aérobiose, la fonction ventriculaire est directement correlée à la concentration tissulaire d'ATP. Ce résultat est en parfait accord avec les travaux de REIBEL et ROVETTO (1978). Cette concentration d'ATP est elle-même dépendante de la consommation d'oxygène. Une relation similaire avait été obtenue par PELOSI et al. (1969) sur l'animal entier. Ce sont dans les conditions optimales d'oxygénation du tissu cardiaque (hématocrite à 35%) qu'un réel équilibre dynamique s'établit entre la consommation d'oxygène, l'utilisation et la production d'ATP. Contrairement à l'ATP, le réservoir de créatine phosphate reste peu sensible aux modifications des conditions d'oxygénation du myocarde. Cette distorsion dans l'évolution des réserves cellulaires d'ATP et de CP a été observée dans d'autres conditions expérimentales par GUBJARNASON et al. (1978); YIPINTSOI et al. (1979). Nos résultats démontrent donc un point très important : dans certaines conditions de perfusion aérobie, le réservoir cellulaire de créatine phosphate n'est pas une grandeur de niveau susceptible de caractériser l'état d'oxygénation du tissu cardiaque.

En revanche, les concentrations cytoplasmiques d'adénines nucléotides non chelatées sont très dépendantes de la capacité de transport en oxygène du perfusat.

La concentration cytosolique d'ADP libre est corrélée à la consommation tissulaire d'oxygène. Il peut s'agir d'un effet direct de l'ADP libre sur la régulation de l'activité de la phosphorylation oxydative mitochondriale (CHANCE et WILLIAMS 1955; LEHINGER 1974; JACOBUS et al. 1982). Lorsque la quantité d'oxygène délivrée au myocarde est limitée, la déplétion d'ADP libre dans

le cytosol entraîne un ralentissement de la fonction oxydative mitochondriale jusqu'à ce qu'un nouvel état d'équilibre entre les apports et les besoins en oxygène du myocarde apparaisse. Ce type de régulation sur l'organe entier aurait une analogie avec celui observé sur des mitochondries isolées (JACOBUS et al. 1982). La respiration mitochondriale et par conséquent la consommation tissulaire d'oxygène seraient directement contrôlées par la concentration extramitochondriale d'ADP libre. Bien que le rapport cytosolique $\frac{ATP_F}{ADP_F}$ ne soit pas directement impliqué dans la régulation de la respiration mitochondriale (JACOBUS et al. 1982), nos résultats montrent une variation inverse de la consommation d'oxygène et du rapport $\frac{ATP_F}{ADP_F}$. En accord avec les travaux de ALTSCHULD et BRIERLEY (1977), toute condition d'oxygénation tissulaire qui favorise l'augmentation du rapport $\frac{ATP_F}{ADP_F}$ entraîne, secondairement, une inhibition de la respiration cellulaire et donc, une réduction de la synthèse d'ATP par la voie mitochondriale.

Le potentiel phosphate cytoplasmique $\frac{ATP_F}{ADP_F . Pi_F}$ considéré comme un important régulateur de la respiration mitochondriale (WILSON et al. 1977) a été calculé à partir des fractions libres d'adénines nucléotides du cytosol et en considérant que les deux premiers sites de la chaîne respiratoire mitochondriale sont à l'équilibre (HOHORST et al. 1962; Mc GILVERY et MURRAY 1974; SAKS et al. 1975; NISHIKI et al. 1978). Ce potentiel est faiblement modifié par un changement de la concentration artérielle en oxygène. En comparaison avec les travaux de NISHIKI et al. (1978), GIESEN et KAMMERMEIER (1980) sur le coeur isolé non travaillant, nous démontrons l'exis-

tence d'une relation décroissante entre le potentiel phosphate et la consommation d'oxygène dans le cas du coeur travaillant. Ce résultat indique que l'activité respiratoire des cellules cardiaques est dépendante de la concentration artérielle en oxygène, et qu'en accord avec les théories de WILSON et al. (1977; 1979) cette régulation de l'activité respiratoire fait intervenir le potentiel phosphate cytoplasmique. En admettant qu'il existe un couplage respiration-phosphorylation dans les mitochondries de coeurs travaillant, le changement d'énergie libre Δ_G ATP signifie que le potentiel d'oxydo-réduction du cytochrome C est dépendant de la concentration artérielle en oxygène ($\Delta_G = n F \Delta E$). Cependant, le changement d'oxydation du cytochrome C est insuffisant pour expliquer la diminution de la consommation d'oxygène du coeur perfusé avec une faible CaO_2. La transition CaO_2 forte-CaO_2 faible entraîne une incapacité du myocarde à maintenir une activité respiratoire normale. Il semble donc que ce soit au niveau du troisième site de la phosphorylation que se fasse cette limitation de la respiration. Dans cette hypothèse, l'oxygène qui est le dernier accepteur d'électrons devient le facteur limitant de la respiration des cellules cardiaques.

Il est évident qu'en dehors de l'oxygène proprement dit, d'autres facteurs sont susceptibles de prendre un rôle dans cette limitation de la respiration mitochondriale: la concentration et le transport des phosphates inorganiques (WILSON et al. 1974), la disponibilité des substrats (OWEN et WILSON 1974; NISHIKI et al. 1978), et le rapport matriciel ATP/ADP (ALTSCHULD et BRIERLEY 1977). On voit donc que l'adaptation du coeur à une variation de CaO_2 est complexe car toute variation de la respiration cellulaire entraîne une modification de l'état énergétique du muscle cardiaque et en particulier de la charge totale en énergie (ATP + 1/2 ADP/ Σ ANP), qui peut, elle-même, intervenir sur l'activité de certains enzymes clé de la glycolyse comme la phospho fructo kinase (ATKINSON 1968).

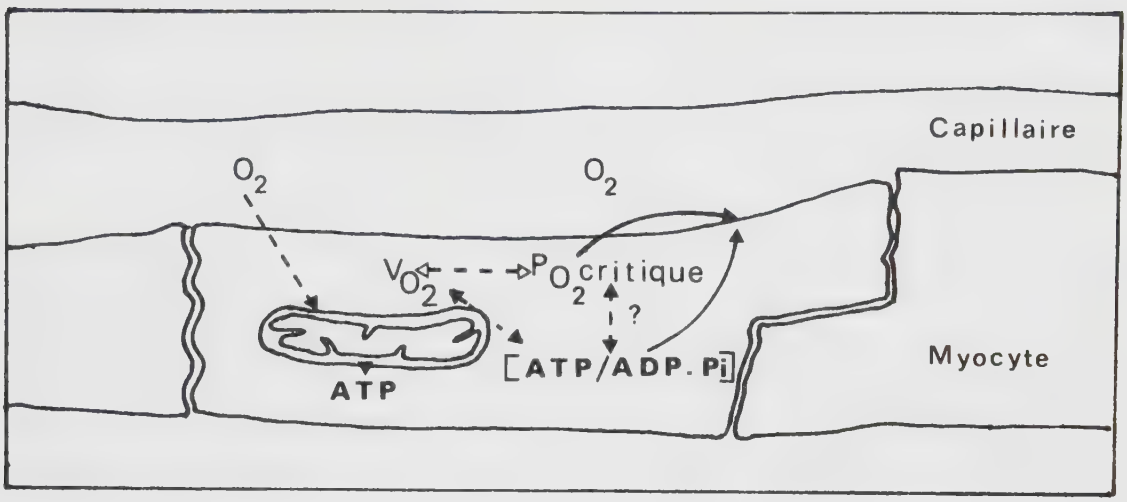


FIGURE 20

Représentation schématique de l'interdépendance entre l'oxygénation tissulaire et le métabolisme énergétique cellulaire.

VO_2: consommation myocardique d'oxygène

ATP/ADP.Pi : potentiel phosphate cytoplasmique

La quantité d'oxygène disponible pour le muscle cardiaque détermine une limite de l'activité aérobie. Cette limite est atteinte lorsque le rapport : apport d'oxygène/besoin d'oxygène devient inadéquate (WEBER et al. 1980). Dans le cas d'un modèle de coeur isolé et travaillant, une diminution significative de la SO_{2T} est tolérable aussi longtemps que la distribution d'oxygène au tissu satisfait l'équilibre dynamique apport-besoin en oxygène. Dans les conditions extrêmes où l'oxygène est uniquement transporté sous forme dissoute (hématocrite 0%, CaO_2 1.75 ml O_2/ 100 ml), ce substrat devient un réel facteur limitant de la fonction cardiaque et de l'activité oxydative mitochondriale.

Ainsi, la phosphorylation oxydative mitochondriale peut être considérée comme le"détecteur sensible" de toute variation de l'état d'oxygénation des tissus,ce détecteur serait ainsi impliqué dans l'élaboration d'une information métabolique nécessaire à la régulation de l'oxygénation tissulaire locale (GAUDUEL 1982). Cette hypothèse a été récemment reprise par WILSON et al. (1983) sur un modèle de coeur isolé non travaillant. L'intervention d'une composante énergétique dans la régulation de la distribution de l'oxygène au tissu doit être retenue. Le rôle du potentiel de phosphorylation cytosolique comme "second messager" de la transmission de l'information au système vasculaire n'est pas à exclure (figure 20); le premier messager étant l'oxygène lui-même. Cette hypothèse permettra, peut-être, de clarifier la notion de PO_2 critique définie par CHANCE (1965) ou FISHER et DODIA (1981) et d'apporter une nouvelle compréhension des mécanismes de régulation qui lient le métabolisme énergétique aux processus d'oxygénation du tissu cardiaque.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS THÉORIQUES : MODÈLE MATHÉMATIQUE DE DISTRIBUTION DE L'OXYGÈNE COUPLÉE AU MÉTABOLISME GLUCIDIQUE DU MYOCARDE ; EFFET DE LA CONCENTRATION ARTÉRIELLE EN OXYGÈNE ET DE LA PO_2 ARTÉRIELLE.

IV-A. INTRODUCTION.

Le but de ce travail théorique est d'aider à la compréhension des phénomènes d'adaptation du muscle cardiaque lors d'une variation en échelon de la concentration artérielle en oxygène et de la PO_2 artérielle. Ce modèle représente une unité fonctionnelle d'échange comportant un compartiment vasculaire (CV) et un comportement tissulaire (CT). Les transferts de l'oxygène et des substrats métaboliques (glucose, pyruvate et lactate) sont décrits par des équations différentielles comprenant une composante de convection et une composante de diffusion. La simulation du caractère actif ou passif de certains transports membranaires de métabolites est effectuée en modifiant le rapport des constantes de transfert.

Les équations qui vont être décrites correspondent à des bilans de conservation de la masse pour chaque compartiment et à des équations de cinétiques chimiques (figure 21). Bien qu'il ne prenne en

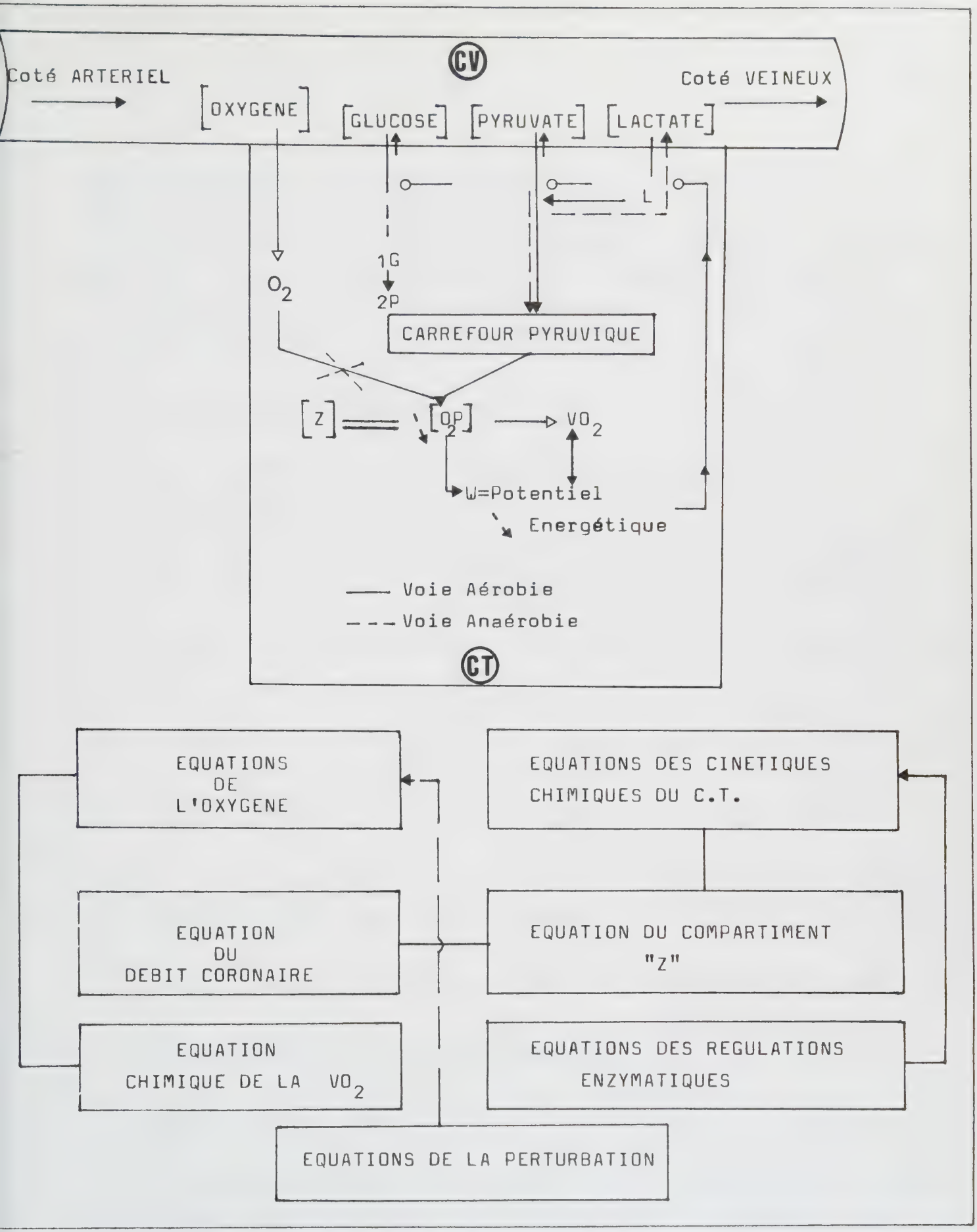


FIGURE 21

Représentation modélisée de l'unité fonctionnelle d'échange.

considération que les chaînes essentielles du métabolisme glucidique, ce modèle permet de mieux comprendre la régulation progressive de ce métabolisme lorsque la qualité de l'oxygénation du myocarde est modifiée. Les équations différentielles non linéaires ont été résolues sur calculateur numérique (HP 21 MX) à l'aide d'un algorithme de RUNGE-KUTTA du 4ème ordre.

IV-B. EQUATIONS DU MODELE.

IV-B.1 - Equations différentielles de l'oxygène.

* Compartiment vasculaire.

La pression partielle en oxygène de ce compartiment est supposé homogène et en équilibre avec la pression veineuse en oxygène.

$$(1) \quad \frac{d\,Pv}{dt} = Vc.\ s\left[Q\left(Ca-Cv\right) - K\left(Pv - P_T\right)\right]$$

* Compartiment tissulaire.

$$(2) \quad \frac{d\,P_T}{dt} = \frac{1}{V_T\,\alpha}\left[K\left(Pv - P_T\right) - Vo_2\right]$$

Ce sont les mêmes équations écrites sous forme différentielle que celles du modèle décrit précédemment.

IV-B.2 - Equations différentielles des cinétiques chimiques.

* Glucose du compartiment vasculaire.

$$(3) \quad \frac{d\,G_v}{dt} = \frac{1}{vc}\left[Q\left(G_A - G_V\right) - K_{G1}.G_V + KG_2\ G_T\right]$$

Le transport transcapillaire du glucose est représenté à l'aide de deux coefficients (K_{G1} et K_{G2}), ce qui permet de simuler éventuellement un transport actif du glucose.

* Glucose du compartiment tissulaire.

$$(4)\quad \frac{d\,G_T}{dt} = \frac{1}{V_T}\left[K_{G1}.G_V - K_{G2}.G_T - K_{GP}.G_T + K_{PG}.PY_T.PY_T\right]$$

Cette équation prend en considération l'arrivée du glucose dans le compartiment tissulaire et sa transformation en pyruvate, par la voie de la glycolyse (1 glucose → 2 molécules pyruvate).

* Pyruvate dans le compartiment vasculaire.

$$(5)\quad \frac{d\,PY_V}{dt} = \frac{1}{VC}\left[Q\left(PY_A - PY_V\right) - K\,PV_T\left(PY_V - PY_T\right)\right]$$

Le sort du pyruvate dans le compartiment vasculaire est régit par de simples mécanismes de convection et de diffusion.

* Pyruvate dans le compartiment tissulaire.

$$(6)\quad \frac{d\,PY_T}{dt} = \frac{1}{V_T}\left[KP_{VT}\left(PY_V - PY_T\right) + K_{GP}.G_T - K_{PG}.PY_T.PY_T + K_{PL}.PY_T + K_{LP}.LA_T + K_{ZP}.Z - K_{PZ}.P_T.PY_T\right]$$

Dans ce compartiment tissulaire, l'équation différentielle du pyruvate tient compte :

- des échanges de pyruvate par simple diffusion
- de la cinétique de transformation du glucose en pyruvate et de la cinétique de transformation du pyruvate en lactate
- d'une oxydation des coenzymes réduits formés lors de l'activité du cycle de KREBS. Ce cycle est considéré être alimenté par le carrefour pyruvique. L'état d'oxydation des coenzymes réduits a été considéré être dépendant de la PO_2 tissulaire.

* Lactate du compartiment vasculaire.

$$(7)\quad \frac{d\,LA_V}{dt} = \frac{1}{VC}\left[Q\left(LA_A - LA_V\right) - KL_{VT}\left(LA_V - LA_T\right)\right]$$

Cette équation fait intervenir un terme de convection et un terme de diffusion.

* Lactate du compartiment tissulaire.

$$(8)\quad \frac{d\,LA_T}{dt} = \frac{1}{Y_T}\left[KL_{VT}\left(LA_V - LA_T\right) + K_{PL}.PY_T - K_{LP}.LA_T\right]$$

IV-B.3 - Equation différentielle du sous-compartiment Z.

Les différentes voies métaboliques d'utilisation du glucose, du pyruvate et du lactate aboutissent au carrefour pyruvique. Ce carrefour pyruvique permet d'alimenter, dans les conditions normales d'aérobie, le cycle de KREBS. Dans ce modèle théorique, nous avons considéré le cycle de KREBS comme un métabolisme intermédiaire symbolisé par une grandeur de niveau Z. Cette grandeur de niveau est assimilable à une concentration d'un complexe O_2P définit par la relation suivante :

$$\underset{\text{oxygène}}{O_2} + \underset{\text{Pyruvate}}{P} \rightleftharpoons O_2P \longrightarrow W$$

Ce complexe (O_2P) peut être assimilé aux nombreuses étapes de production de coenzymes réduits et aux chaînes de phosphorylation oxydative aboutissant à la production d'un produit W de nature énergétique appelé portentiel énergétique.

$$(9)\quad \frac{d\,Z}{dt} = K_{PZ}.P_T.PY_T - K_{ZP}Z - K_{ZW}\,Z$$

Le premier terme de cette équation exprime que la formation de la

variable Z est proportionnelle à la PO_2 tissulaire et à la concentration tissulaire de pyruvate. Le dernier terme représente une transformation irréversible du complexe O_2P en énergie = potentiel énergétique

(10) $W = f.Z$

On remarque que dans cette hypothèse, la consommation d'oxygène est, à une constante près, définie par le premier terme de l'équation différentielle de Z.

(11) $VO_2 = e.K_{PZ}.\ P_T.P_{YT}$

IV-B.4 - Equations de régulations enzymatiques.

L'activité de certaines enzymes du métabolisme glucidique est modulée par des régulations intrinsèques liées à l'intervention de substances intracellulaires. Nous avons représenté ces régulations enzymatiques en faisant agir le potentiel énergétique sur les constantes de vitesse de certaines réactions chimiques ou sur les flux de transfert.

* Régulation de la perméabilité membranaire au glycose.

Cette perméabilité peut être augmentée lors d'un déficit énergétique. Ces variations relatives des coefficients de transfert KG_1 et KG_2 peuvent être définies par les équations suivantes :

(12) $KG_1 = KG_{1O} + m\ \left(W_{ref} - W\right)$

(13) $KG_2 = KG_{2O} - n\ \left(W_{ref} - W\right)$

* Régulation des constantes de vitesse.

De la même façon, les constantes de vitesse de certaines réactions enzymatiques de la glycolyse peuvent être exprimées par les équations suivantes :

transformation glycose $\longleftrightarrow$ pyruvate :

$$(14) \quad K_{GP} = K_{GPO} + P \left(W_{ref} - W\right)$$

$$(15) \quad K_{PG} = K_{PG} - P \left(W_{ref} - W\right)$$

transformation pyruvate $\longleftrightarrow$ lactate :

$$(16) \quad K_{PL} = PL_{O} + q \left(W_{ref} - W\right)$$

$$(17) \quad K_{LP} = K_{LPO} - \left(W_{ref} - W\right)$$

IV-B.5 - Equation du débit coronaire.

$$(18) \quad Q = a.\ R\ VIS\ .\ K.\ \frac{f.\ Z}{f.Z+0.3}$$

Cette manière de formuler le débit coronaire tient compte :

- des variations éventuelles de la viscosite (R VIS)
- de l'énergie intrinsèque cardiaque : à une constante près il s'agit d'une composante métabolique
- d'une variation de la densité capillaire K.

L'expression du débit coronaire montre en effet que le débit coronaire est proportionnel à la densité capillaire. Pour simuler l'augmentation du débit coronaire devant une baisse de la PO_2 tissulaire (quelqu'en soit le mécanisme), on suppose que le coefficient K augmente lorsque la PO_2 tissulaire diminue en dessous d'une certaine valeur de référence. L'équation décrivant comment

K est fonction de la PO_2 tissulaire est représentée sous la forme d'une équation différentielle du premier ordre pour pouvoir introduire un retard plus ou moins important lors de la régulation :

$$(19) \quad \frac{dK}{dt} = \frac{1}{\tau} \left[K_{repos} + Gain \left(P_{Tref} - P_T \right) - K \right]$$

IV-B.6 - Définition des paramètres utilisés dans les équations du modèle.

Sigle utilisé	Définition du paramètre ou de la variable	Valeur d'initialisation
P_V	Pression partielle en oxygène du compartiment vasculaire	31 mm Hg
C_A	Concentration artérielle en oxygène	calculée
C_V	Concentration en oxygène du sinus veineux coronaire	calculée
V_C	Volume du compartiment vasculaire	0.2 ml
Q	Débit coronaire	3.2 ml/min.
K	Coefficient global de transfert entre capillaire et tissu	0.012 ml O_2/min/mm Hg
P_T	Pression partielle en oxygène du compartiment tissulaire	6.5 mm Hg
S	Pente de la courbe de dissociation de l'hémoglobine, calculée par la formule de DEFARES et VISSER : $S = (1 - e^{-\delta P})^2$ avec $\delta = 1.23/P_{50}$	Calculée
α	Coefficient de solubilité de l'oxygène dans le compartiment tissulaire	310^{-5} ml O_2/mm Hg
V_T	Volume du compartiment tissulaire	0.8 ml
VO_2	Consommation tissulaire d'oxygène	0.3 ml/min.

G_A	Concentration artérielle de glucose	11 µM/ml
G_V	Concentration veineuse de glucose	9.4 µM/ml
K_{G1}	Coefficient de transfert de glucose du CV vers CT	0.55 ml/min.
K_{G2}	Coefficient de transfert de glucose du CT vers CV	0.01 ml/min.
G_T	Concentration tissulaire de glucose	17 µM/ml
K_{GP}	Constante de vitesse de transformation glucose-pyruvate	calculée
K_{PG}	Constante de vitesse de transformation pyruvate-glucose	calculée
PY_T	Concentration de pyruvate intracellulaire	0.32µ M/ml
KP_{VT}	Coefficient de transfert de pyruvate (CV vers CT)	1.5 ml/min
PY_A	Concentration artériel de pyruvate	2 µM/ml
PY_V	Concentration veineuse de pyruvate	1.45µM/ml
KL_{VT}	Coefficient de transfert de lactate (CV vers CT)	0.01 ml/ml
K_{PL}	Constante de vitesse de transformation pyruvate-lactate	calculée
K_{LP}	Constante de vitesse de transformation lactate-pyruvate	calculée
LA_T	Concentration tissulaire de lactate	6.6 µM/ml
Z	Concentration tissulaire du complexe OP	0.105 µM
LA_V	Concentration veineuse de lactate	1.007 µM/ml
LA_A	Concentration artérielle de lactate	1.009 µM/ml

f	Coefficient	5.5 M
W	Potentiel énergétique	
Gain	Gain de la boucle de régulation coronaire	$25\ 10^{-5}$
τ	Constante de temps de la boucle de régulation du débit coronaire	20 S
$P_{T\ ref}$	PO_2 tissulaire de référence	6.6
W_{ref}	Potentiel énergétique de référence	0.75
K repos	Valeur du coefficient K lorsque $P_{T\ ref} = P_T$	0.011 ml O_2/min/ mm Hg
a	Coefficient de proportionalité entre Q et K	400
e	Coefficient de proportionalité entre VO_2 et Z	0.0672 ml/µM
R VIS	Viscosité relative = Vis. Hte 45 % / Vis. à hte variable	
	Cette Vis. à Hte variable est donnée par la formule de VAND :	
	Vis.Hte Var = $1 + 0.025$ Hte $+ 7.35\ 10^{-4}$ Hte ^{2}	
PA_{O2} imposé	PO_2 artérielle imposée	125 mm Hg
HT imposé	Hématocrite imposé	35 %
PA	PO_2 artérielle	135 mm Hg
HT	Hématocrite	40 %
T_{PA}	Constante de temps	10 s.
T_{HT}	Constante de temps	10 s.
K_{GPO}	Constante de vitesse référence	0.007 ml/min.
K_{PGO}	Constante de vitesse référence	0.09 ml/min.
K_{PLO}	Constante de vitesse référence	1 ml/min.

K_{LPO}	Constante de vitesse référence	0.05 ml/min^{-1}
K_{PZ}	Constante de vitesse de référence	0.035 $ml/min^{-1}mmHg^{-1}$
K_{ZP}	Constante de vitesse de référence	$5\ 10^{-6}\ min^{-1}$
K_{ZW}	Constante de vitesse de référence	0.7 min^{-1}
p	Coefficient	0.001
m	"	0.001
n	"	0.001
l	"	0.015
q	"	0.010
r	"	0.010

IV-C. INTRODUCTION DES PERTURBATIONS SUR LE MODELE.

De nombreuses perturbations sont possibles sur ce modèle théorique. Nous nous sommes particulièrement intéressés à simuler nos conditions expérimentales, c'est-à-dire l'effet d'une variation de la concentration artérielle en oxygène, par modification de l'hématocrite, sur l'adaptation de la fonction cardiaque.
Ces résultats théoriques peuvent être confrontés avec les résultats expérimentaux présentés dans le chapitre précédent.

Comme il existe un certain décalage temporel entre un changement de la PO_2 artérielle ou de l'hématocrite dans le circuit de perfusion et la valeur instantanée de la PO_2 ou de l'hématocrite dans le compartiment vasculaire (décalage lié à la circulation coronaire et aux espaces morts du circuit), nous avons représenté un retard du premier ordre pour ces deux variables :

$$(20)\quad T_{PA} + \frac{d\,P_A}{dt} + P_A = P_AO_2 \text{ imposée}$$

$$(21)\quad T_{HT} + \frac{d_{HT}}{dt} + HT = HT \text{ imposé}$$

IV-D. RESULTATS ET DISCUSSION.

La perturbation simulée par ce modèle correspond à une baisse de la concentration artérielle en oxygène du perfusat par diminution de l'hématocrite de 35 à O %. Parallèlement, la pression partielle d'oxygène est augmentée de 120 à 600 mm de mercure dans le circuit artériel.
La figure 22 représente l'effet de cette perturbation sur l'évolution temporelle du débit coronaire (Q COR) de la consommation cardiaque d'oxygène (M VO_2) et de la pression partielle d'oxygène dans le tissu cardiaque (PO_2 T). Après l'obtention d'un état de base de ces différents paramètres lors d'une perfusion avec une CA_{O2} de 14.5 ml O_2/100 ml et un hématocrite à 35%, une baisse de la Ca_{O2} à 1.8 ml O_2/100 ml entraîne une augmentation du débit coronaire de près de 400 %. Cependant, cette vasodilatation est insuffisante pour maintenir la consommation d'oxygène et la PO_2 tissulaire à leurs valeurs initiales.

A ces troubles de l'oxygénation du tissu cardiaque sont associées une augmentation de la captation de glucose et de pyruvate alors que le myocarde produit une légère quantité de lactate (figure 23). Parallèlement, les concentrations tissulaires de lactate et de pyruvate augmentent d'une manière significative.

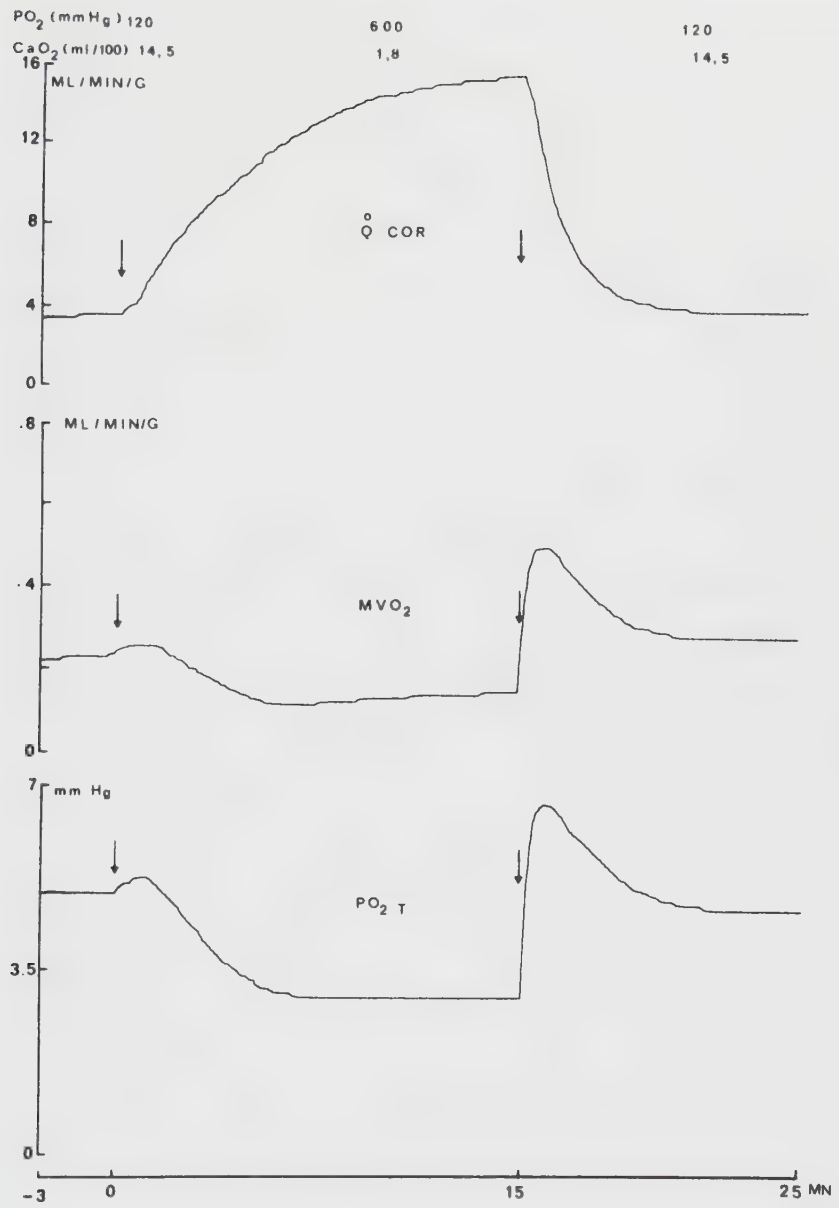


FIGURE 22

Evolution théorique du débit coronaire (Q cor), de la consommation d'oxygène (MVO_2) et de la PO_2 tissulaire (PO_2T).

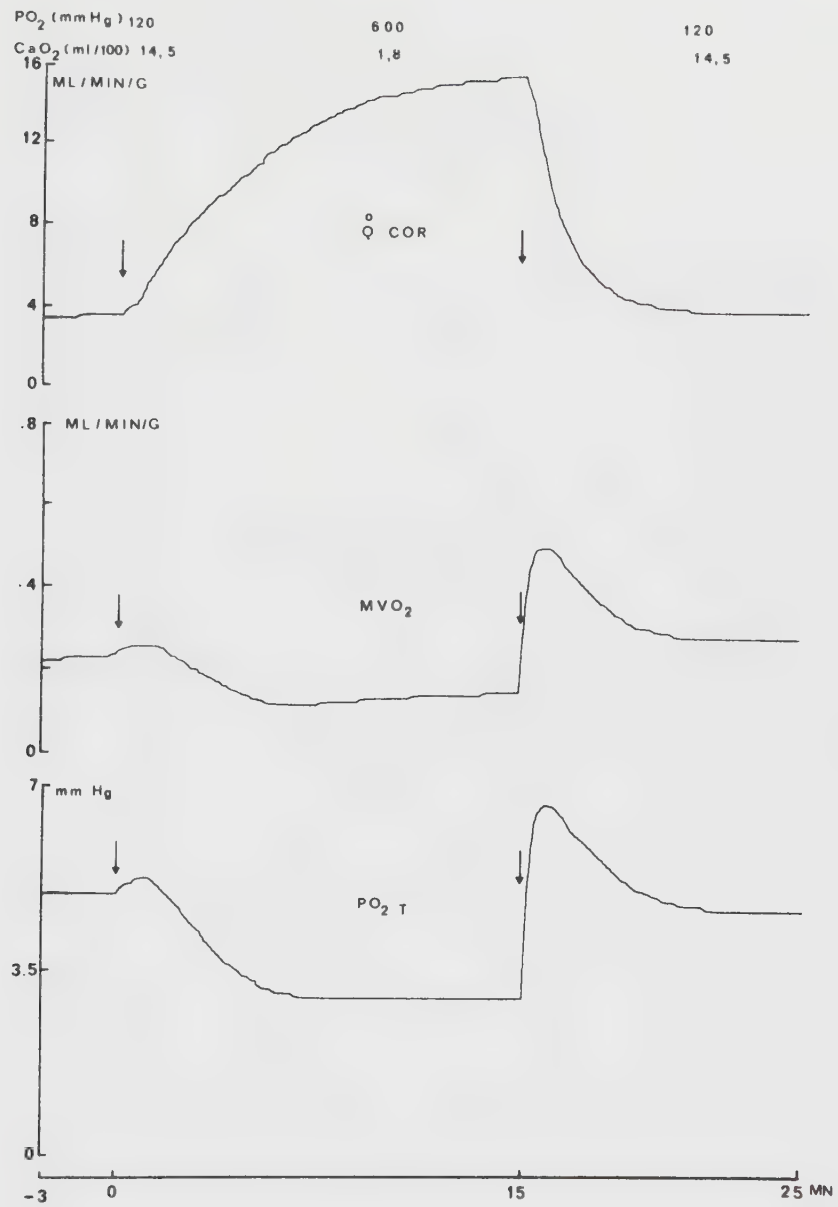


FIGURE 22

Evolution théorique du débit coronaire (Q cor), de la consommation d'oxygène (MVO_2) et de la PO_2 tissulaire (PO_2T).

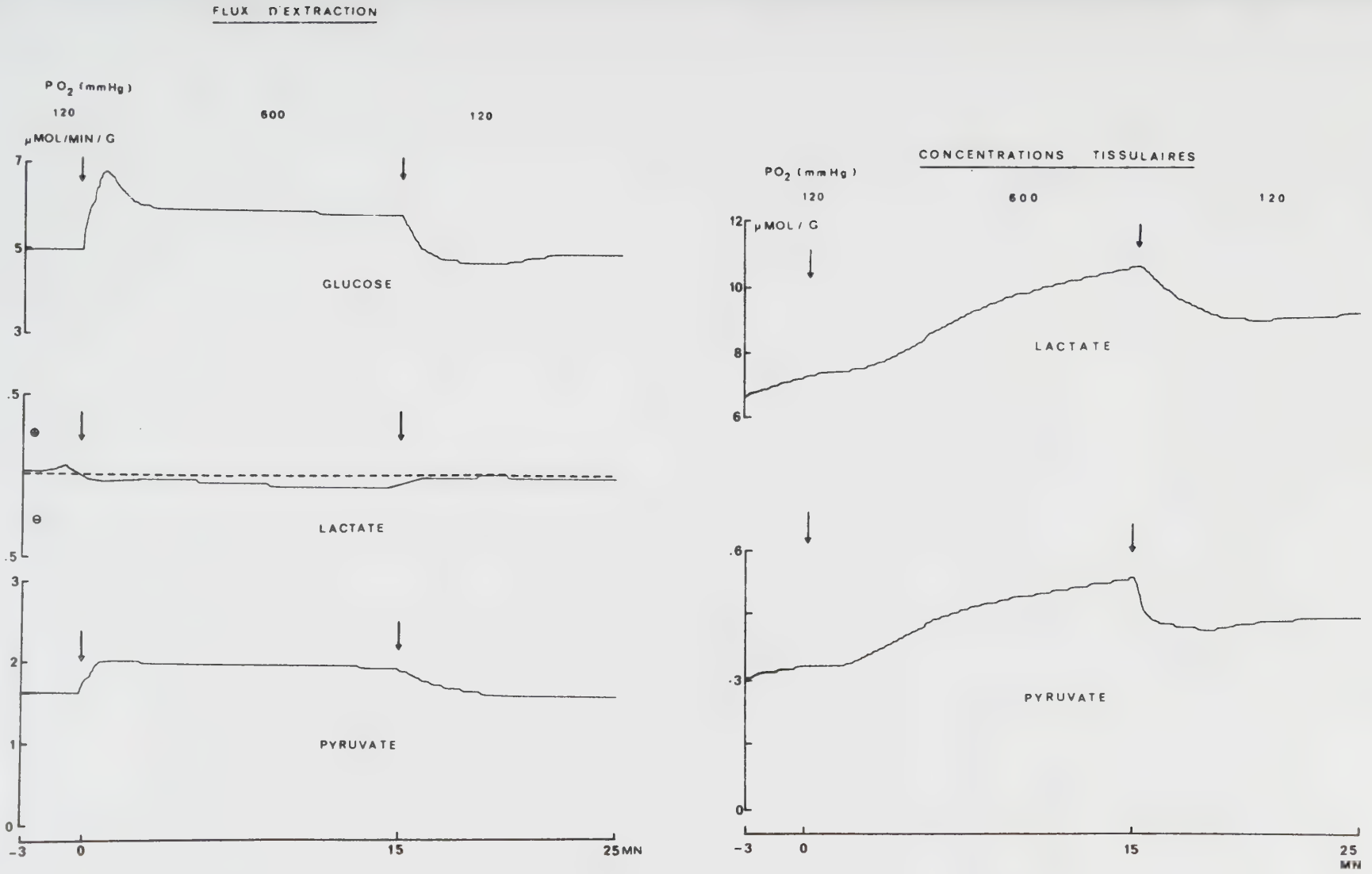


FIGURE 23

Evolutions théoriques des paramètres métaboliques.

Ces perturbations hémodynamiques et métaboliques sont réversibles puisqu'un nouvel état d'équilibre, proche de l'état initial, est obtenu lorsque la concentration artérielle en oxygène passe de 1.8 à 14.5 ml O_2/100 ml et que la PO_2 artérielle revient égale à 120 mm Hg.

Malgré les difficultés d'ajuster parfaitement tous les paramètres physiques et métaboliques de ce modèle, les résultats théoriques obtenus sont en accord avec les résultats expérimentaux présentés dans le chapitre III.

Ce modèle théorique renforce la conclusion selon laquelle le muscle cardiaque transitoirement soumis à des conditions d'oxygénation subphysiologiques (hématocrite 0%, CaO_2 faible et la PaO_2 élevée) se trouve dans un état réversible de dysoxie (ROBIN 1980). Cet état est caractérisé par une limitation des performances cardiaques, une réduction de la consommation d'oxygène et une activation de la glycolyse.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.

La technique de perfusion utilisée permet d'obtenir une grande stabilité de la préparation de coeur isolé travaillant et d'atteindre des performances qu'aucun autre modèle expérimental n'est en mesure de fournir.

En adaptant les caractéristiques physiques du circuit en fonction de la taille des coeurs perfusés, nous avons également obtenu des résultats significatifs avec le coeur de lapin (GAUDUEL et al. 1980). Avec des lapins de 2,5 Kg-3 Kg, la taille du coeur permet d'introduire, sans trop de difficultés, un capteur de pression intraventriculaire par voie sigmoïdienne (capteur MILLAR, PC 340, 4 F). Le tableau 5 regroupe les données expérimentales des caractéristiques hémodynamiques de la circulation du coeur de lapin après une heure de perfusion avec un sang reconstitué à hématocrite 35 %. Les états de base peuvent être modifiés par une variation de la précharge (5-12 mm Hg). Dans ces conditions, les captations de glucose, lactate et pyruvate sont des fonctions croissantes de la contractilité du ventricule gauche caractérisées par l'index dP/dt max (figure 24). La consommation d'oxygène peut être correlée à l'activité contractile du myocarde.

TABLEAU 5.

CARACTERISTIQUES HEMODYNAMIQUES DE LA CIRCULATION CARDIAQUE "IN VITRO".

Les coeurs de lapin (n=10) sont perfusés sous une précharge de 9 mm Hg, une postcharge de 75 mm Hg. Les caractéristiques du sang sont : PaO_2 (130 mm Hg), CaO_2 (15.5 ml O_2/100 ml), glucose (11 mM), Lactate (0,9 mM), pyruvate (1.2 mM).

Débit cardiaque (ml/min)	292 ± 21
Débit coronaire (ml/min)	15.2 ± 2.3
Fréquence (battements/min)	215 ± 3
Consommation d'oxygène (ml O_2/min)	1.34 ± 0.06
Travail externe (J/min)	3.2 ± 0.1
Pression aortique moyenne (mm Hg)	92 ± 3

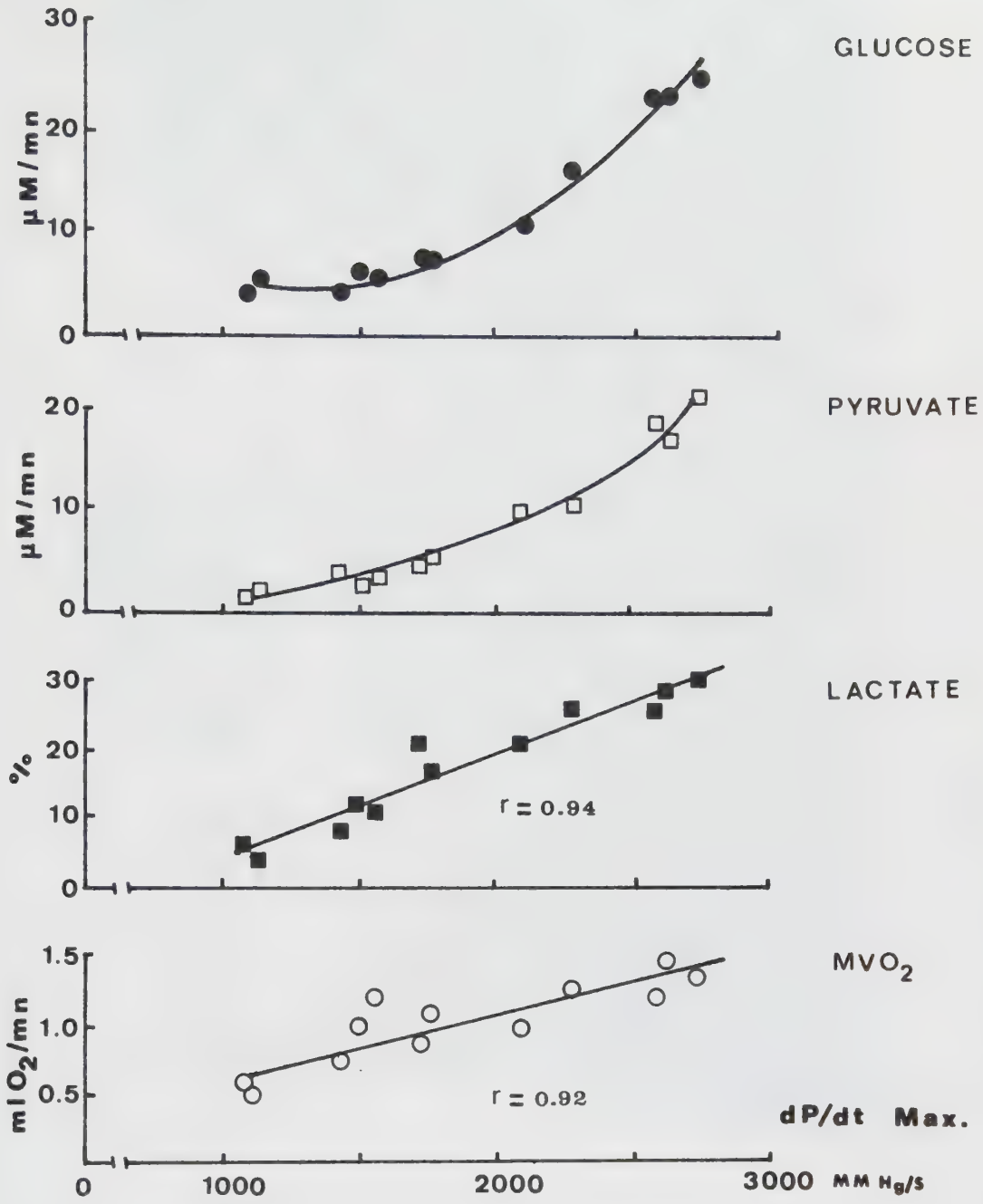


FIGURE 24

Effet de la contractilité du myocarde sur la captation de glucose, pyruvate, lactate et sur la consommation d'oxygène.

(Coeurs isolés de lapin, perfusés avec du sang)

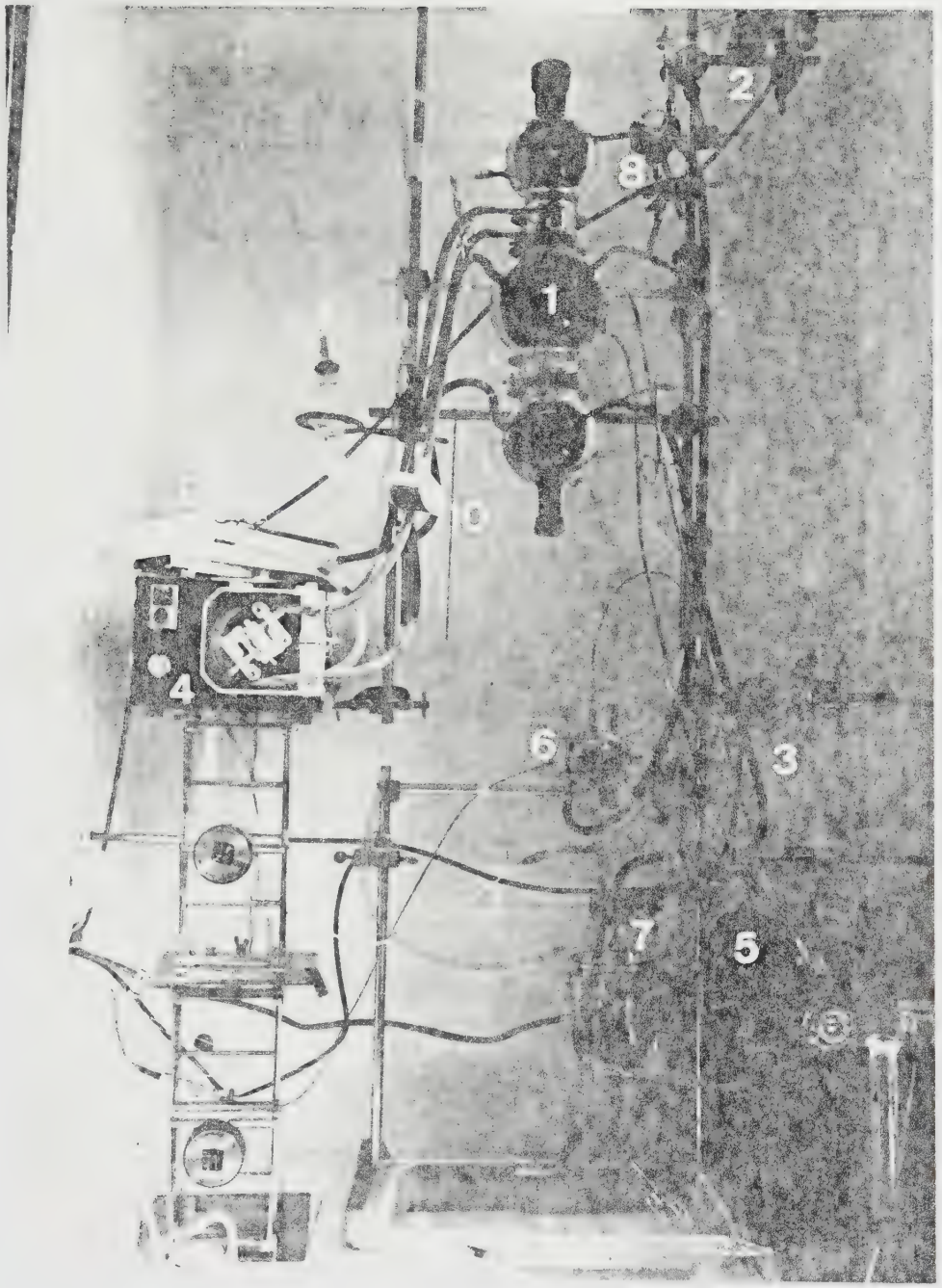


FIGURE 25

Circuit de perfusion pour préparation de coeur isolé et travaillant. La perfusion est effectuée avec une recirculation coronaire.

(1) Réservoir d'oxygénation, (2) régulateur du débit aortique, (3) régulateur du débit coronaire, (4) pompe aortique, (5) pompe coronaire, (6) chambre d'éjection, (7) canules, (8) réservoir d'expansion. (9) oxygénateur. (10) filtre.

(Photo présentée avec l'autorisation du Laboratoire de Pharmacodynamie. Centre de Défense Nucléaire Biologique et Chimique - Vert Le Petit).

Cette préparation de coeur isolé travaillant et d'un intérêt non négligeable en expérimentation "in vitro" lorsque le milieu de perfusion est un sang reconstitué. Dans ces conditions de perfusion, l'essentiel de la fonction du ventricule gauche est conservé. La figure 25 représente un modèle expérimental original en circuit fermé, avec recirculation coronaire, que nous avons développé pour des études de pharmacologie et plus spécialement de toxicologie cardiaque.

La stabilité de cette technique de coeur isolé travaillant est dûe, en partie, à l'absence d'interface entre le milieu de perfusion et les gaz ou l'air ambiant. L'utilisation d'oxygénateurs à membrane est nécessaire.
D'autre part, il va de soi que l'utilisation de milieux de perfusion "plus physiologiques" que toute solution électrolytique dépourvue de globules rouges renforce la durée de cette stabilité et crée des conditions expérimentales comparables aux conditions physiologiques. Le tableau 6 permet une comparaison entre les caractéristiques hémodynamiques de la circulation cardiaque de rats mesurées "in vivo" par VIZEK et ALBRECHT (1973) et celles obtenues dans cette présente étude. Notons que dans les conditions artificielles de notre étude, le ventricule droit n'effectue aucun travail externe. Aussi, il n'est pas étonnant d'obtenir un travail cardiaque externe plus faible que celui mesuré "in situ". De plus, nous avons mesuré la pression aortique moyenne au niveau de la chambre d'éjection afin d'éviter toute perturbation d'écoulement dans la portion de la canule sus-sigmoïdienne. Les valeurs de pression moyenne mesurées sont vraissenblablement plus faibles et réduisent d'autant la valeur calculée du travail externe.

En réponse aux autres modèles expérimentaux utilisés avec une solution électrolytique dépourvue de globules rouges (NEELY et al. 1967 a, b; BUNGER et al. 1975, 1979; TAEGTMEYER et al. 1980),

TABLEAU 6.

CARACTERISTIQUES HEMODYNAMIQUES
DE LA CIRCULATION CARDIAQUE "IN VIVO" ET "IN VITRO".

PARAMETRES	TRAVAUX DE VIZEK ET ALBRECHT. (In vivo) Rats de 350 g.	TRAVAUX DE GAUDUEL, MARTIN, DUVELLEROY et al. (In vitro) Rats de 300 - 350 g. (n=10)
Débit cardiaque (ml/min/g)	118	97 $\pm$ 5
Fréquence (battements/min)	367	355 $\pm$ 10
Travail externe (J/min/g)	1.75	0.84 O $\pm$ 0.012
Consommation d'oxygène du ventricule gauche (ml O_2/min/g)	0.680	0.400 $\pm$ 0.015

nous nous sommes attachés à étudier les capacités d'adaptation hémodynamique et métabolique du muscle cardiaque soumis à une diminution de la concentration artérielle en oxygène. Cette diminution est dûe à la seule absence d'érythrocytesdans le milieu de perfusion. Cette perturbation dans le transport circulatoire de l'oxygène au tissu cardiaque est responsable d'une altération des caractéristiques hémodynamiques de la circulation cardiaque et d'un ralentissement du métabolisme oxydatif et énergétique. Il est intéressant de souligner que l'interdépendance oxygène-métabolisme énergétique sur l'organe entier est comparable à celle observée sur des populations de cellules ou de mitochondries isolées (HASSINEN et HILTUNEN 1975; ALTSCHULD et BRIERLEY 1977; GIESEN et KAMMERMEIER 1980).

Les résultats théoriques du modèle mathématique, incorporant simultanément des équations de l'oxygénation tissulaire et des équations de l'activité métabolique, confirment les conclusions établies à partir des résultats expérimentaux. La distribution et l'utilisation de l'oxygène au niveau du tissu cardiaque travaillant sont très dépendantes de la capacité de transport en oxygène du milieu de perfusion. Au cours d'une perfusion avec un sang reconssitué, la résistance vasculaire du réseau coronaire n'atteint pas sa valeur limite et le coefficient d'extraction d'oxygène par le ventricule gauche est de 61% (n=10). Cette valeur est très comparable à celles obtenues sur le coeur "in situ" : 65 à 70% (LOMBARDO et al. 1953; ROWE et al. 1965; WEBER et JANICKI 1979). En présence d'une diminution de la concentration artérielle d'oxygène, l'adaptation coronaire tend vers une saturation et le coefficient d'extraction d'oxygène est supérieur à 93%. De telles valeurs du coefficient d'extraction peuvent être observées "in situ", au cours d'un stress coronaire chez le chien (SHEA et al. 1962; DANIELL 1973) ou lors d'une diminution de l'hématocrite

(CASE et al. 1965). Cette saturation de la réponse coronaire et du coefficient d'extraction d'oxygène interdit toute adaptation du muscle cardiaque à une augmentation des besoins en oxygène provoquée par un accroissement de travail. Dans ces conditions, la limite aérobie est atteinte et un déséquilibre défavorable au maintien de la fonction cardiaque normale, s'établit entre les apports et les besoins en oxygène. Ce nouvel état subphysiologique est réversible et disparait lorsque la concentration artérielle en oxygène est de nouveau augmentée.

Cette étude démontre qu'une limite aérobie de la fonction cardiaque peut être déterminée par une diminution importante de la concentration artérielle en oxygène. Cette limite aérobie correspond à un état hémodynamique et métabolique tel que l'oxygène devient le facteur limitant de la respiration et de l'activité énergétique cellulaire.

DEUXIEME PARTIE

CYTOTOXICITE DE L'OXYGENE MOLECULAIRE AU NIVEAU DU MYOCARDE HYPOXIQUE.

CHAPITRE I

APERÇUS SUR LA CYTOTOXICITE DE L'OXYGÈNE MOLÉCULAIRE.

I-A. INTRODUCTION HISTORIQUE.

En dehors des organismes spécialement adaptés aux exigences de la vie anaérobie, l'essentiel du règne vivant utilise de l'oxygène pour produire l'énergie indispensable à la vie des cellules. Comme nous venons de le voir dans la première partie de ce travail, l'oxygène en tant que substrat exogène participe activement au maintien de l'homéostasie des cellules cardiaques.

Il faut remonter aux premiers travaux de SCHEELE à la fin du XVIIIème siècle pour prendre conscience de l'un des problèmes les plus fascinants de la biologie. Il s'agit plutôt d'un paradoxe pouvant se résumer ainsi : l'oxygène peut être toxique pour tout organisme aérobie dès lors que sa présence est plus importante que celle dans l'air. Bien que la composition de l'air ait variée au cours des temps (BERKNER et MARSHALL 1964; DOLE 1965), un équilibre favorable à la vie aérobie est apparu lorsque le contenu en oxygène de l'air est devenu suffisamment important. Parallèlement, l'acquisition de systèmes de protection contre la toxicité de l'oxygène fut une étape essentielle dans l'évolution et la survie des organismes aérobies (GILBERT 1963, 1964).

C'est avec les importants travaux de Paul BERT (1878) que débute l'ère de l'expérimentation sur la toxicité de l'oxygène. L'investigation expérimentale sur les effets du "poison oxygène" chez l'homme se développe alors rapidement : HILL (1912), BEHNKE (1941, 1942), STADIE et al. (1944), BEAN (1945), BECKER-FREYSENG et CLAMAN (1950). La seconde guerre mondiale contribue au développement des études sur la cytotoxicité de l'oxygène (HALDANE 1941; STADIE et HAUGAARD 1945; DICKENS 1946; HAUGAARD 1946). Apparaissent alors les travaux sur les dommages pulmonaires induits par un air enrichi en oxygène (OHLSSON 1947; HEMINGWAY et WILLIAMS 1952; BEAN et SMITH 1953; BEAU 1964). L'intérêt sans cesse croissant des différentes études menées dans ce domaine allait conduire certains chercheurs à développer la "médecine hyperbare" (JACOBSON et al. 1965). Cette méthode d'oxygénation hyperbare fût utilisée pourle traitement de certaines maladies : augmentation de la sensibilité des tumeurs aux radiations (GRAY et al. 1953, 1964; WEGICKI et al. 1966), traitement de l'intoxication au monoxyde de carbone (SMITH et SHARP 1960; SLUIJTER 1963). Cependant cette technique d'oxygénation fût rapidement critiquée afin de limiter l'utilisation de l'oxygène à haute pression (LAMBERTSEN 1965), d'autant que les effets de l'oxygène hyperbare sur l'activité du système nerveux et sur les principales fonctions physiologiques sont de plus en plus connus GOTTLIEB (1965), CLARK et LAMBERTSEN (1971), PRYOR (1978).

Depuis quelques années, les mécanismes biochimiques de la toxicité de l'oxygène font l'objet de nombreux travaux : LABORIT et BRUE (1963), HAUGAARD (1965, 1968), HALLIWELL (1978), PRYOR (1978), DEL MAESTRO (1980). Néanmoins, les processus chimiques aboutissant à la toxicité de l'oxygène dans les différents types cellulaires sont mal connus car tous les tissus n'ont pas la même sensibilité vis à vis de l'oxygène (CLARK 1974).

Les effets toxiques de l'oxygène sur le muscle cardiaque ne font l'objet d'études que depuis les années 70. Ces investigations restent encore peu nombreuses, de sorte que la connaissance des mécanismes de la toxicité de l'oxygène sur le myocarde est, à nos jours, limitée. En 1972, HEARSE et al. observent sur un modèle expérimental de coeur perfusé qu'une privation d'oxygène (hypoxie) entraîne des désordres cellulaires souvent irréversibles et que ces désordres sont paradoxalement amplifiés si le coeur est de nouveau exposé à de l'oxygène. Cette cytotoxicité de l'oxygène dépend de la PO_2 au moment de la réoxygénation (HEARSE et al. 1978). De plus, la sensibilité du coeur hypoxique vis à vis de l'oxygène dépend de la durée préalable de l'hypoxie.

Chez l'homme, la reperfusion d'un coeur ischémique entraîne des altérations ultrastructurales (SCHAPPER et al. 1977) dont l'importance est fonction de la durée de l'état ischémique. D'une manière générale, la reperfusion ou la réoxygénation induisent, au niveau du myocarde, des désordres cellulaires et des troubles fonctionnels. Ces altérations cardiaques sont paradoxalement plus importantes que celles induites par une ischémie ou une hypoxie (HEARSE et al. 1973, 1975 b, 1976; FEUVRAY et de LEIRIS 1975; GANOTE et al. 1975, 1979) et semblent dépendre d'une action directe ou indirecte de l'oxygène (GANOTE et al. 1980; GUARNIERI et al. 1978, 1980; CALDARERA et al. 1978; SHLAFER et al. 1982 b, GAUDUEL et DUVELLEROY 1983 a, b).

Les travaux que nous avons entrepris depuis plusieurs années ont pour but de préciser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la cytotoxicité de l'oxygène lors de la réoxygénation du muscle cardiaque. Les résultats sont présentés dans deux chapitres. Le chapitre III est consacré au rôle des catécholamines endogènes (adrénaline et noradrénaline) dans le développement des altérations cellulaires induites par une hypoxie et une réoxygénation à PO_2 élevée. Une grande partie de ces résultats ayant fait

l'objet d'un rapport (GAUDUEL 1978), nous nous limiterons à condenser ces travaux à travers la présentation de deux publications. Certains points importants seront particulièrement discutés.

Notre étude sur la cytotoxicité de la réoxygénation a été poursuivie et complétée par la mise en évidence d'une utilisation anormale de l'oxygène par le myocarde hypoxique. Les résultats relatifs à l'attaque peroxydative du myocarde réoxygéné seront présentés dans le chapitre IV et discutés dans le chapitre V.

I-B. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA TOXICITE DE L'OXYGENE.

I-B. 1 - Oxygène moléculaire et radicaux.

L'oxygène moléculaire (molécule diatomique, O_2) possède dans son état fondamental deux électrons non appariés et de spins parallèles sur les orbitalesles plus externes. Ce type d'arrangement de spins empêche l'addition directe d'une paire d'électrons qui nécessiterait, au préalable, une inversion de spin de l'un des deux électrons non appariés de l'oxygène. Cette inversion de spin est relativement lente comparée à la durée de vie des complexes collisionnels. Il résulte de cette restriction de spin (TAUBE 1965) que l'oxygène moléculaire dans son état de base à un caractère oxydant faible (Figure 26).

La réduction tétravalente de l'oxygène moléculaire est possible en biologie car une enzyme catalytique, la cytochrome oxydase, favorise la réduction complète de l'oxygène en eau (figure 27). Parallèlement à cette voie tétravalente, une voie univalente est également possible car elle ne réclame pas d'inversion de spin. Dans ces conditions, la réduction complète d'une molécule d'oxygène induit la formation de composés intermédiaires : les radicaux de

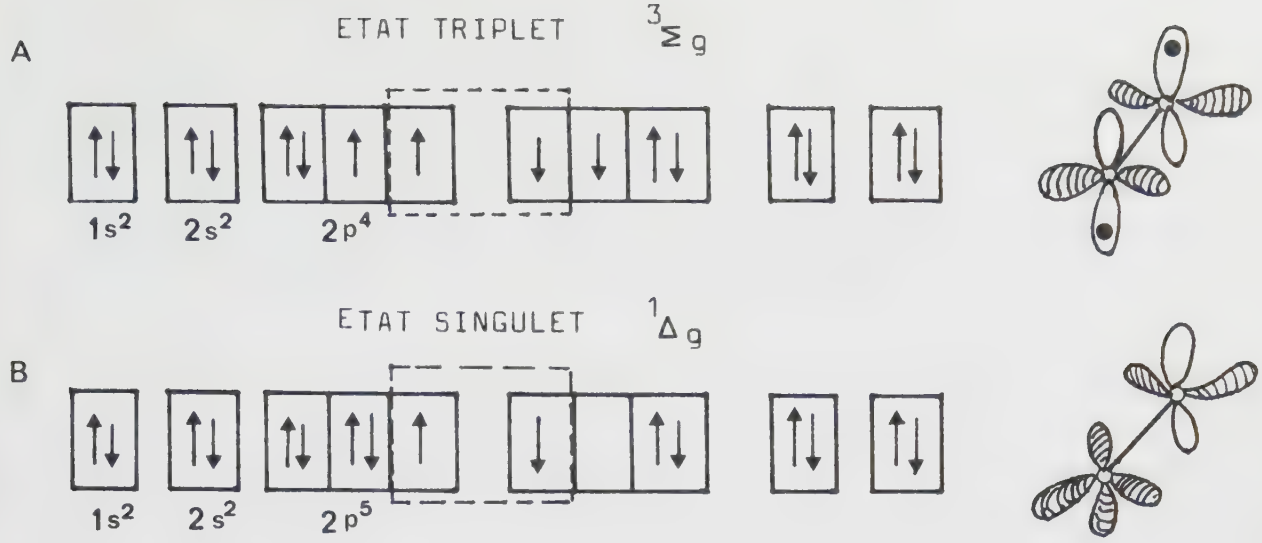


FIGURE 26

Etats électroniques de l'oxygène moléculaire (O_2).

A. Etat fondamental : $^3\Sigma_g$ O_2

B. Etat excité : $^1\Delta_g$ O_2

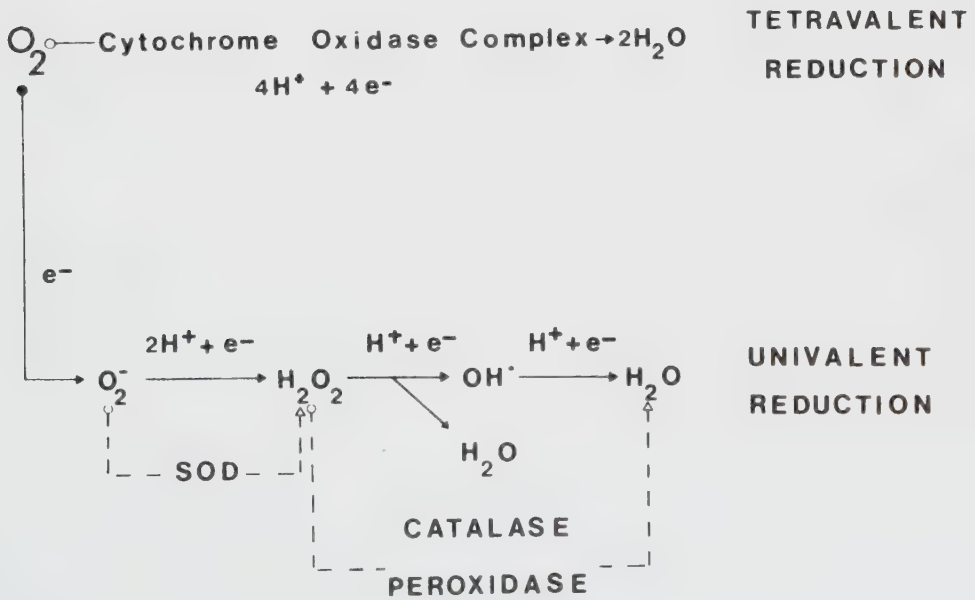


FIGURE 27

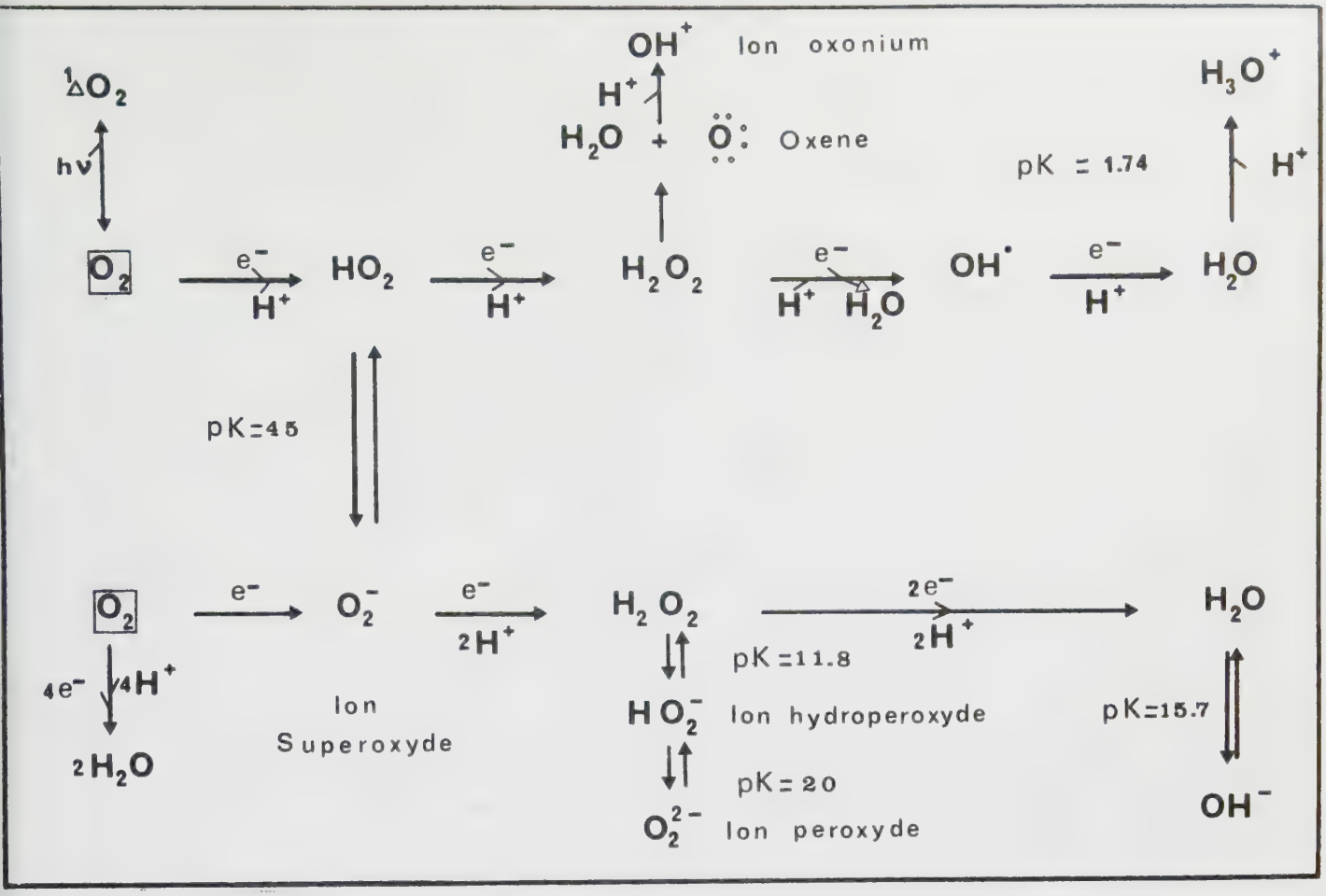
Différentes voies de réduction de l'oxygène moléculaire.

l'oxygène (figure 27). Ces radicaux sont des espèces chimiques contenant un nombre impair d'électrons. La contribution de la voie univalente dans la réduction de l'oxygène au niveau des cellules aérobies reste faible mais non nulle : BRITTON et al. 1978; FRIDOVICH 1978 a, b; DEL MAESTRO 1980.

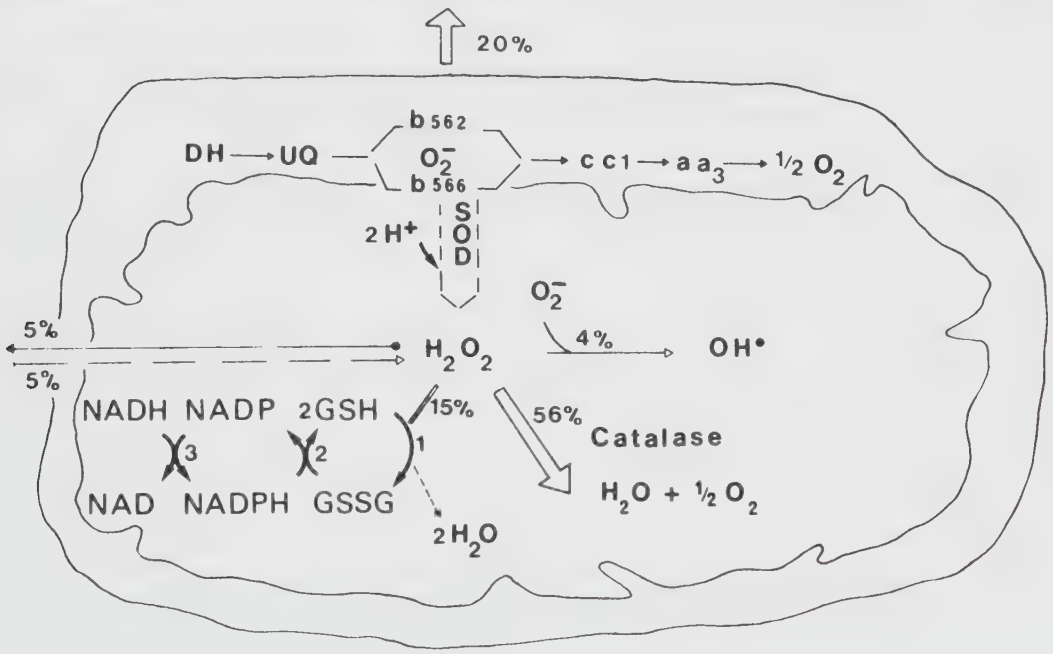
Les radicaux de l'oxygène peuvent être produits par une grande variété de réactions biologiques (figure 28 a). De nombreux travaux ont montré que des enzymes cellulaires impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction peuvent induire la réduction univalente de l'oxygène en ion superoxyde (O_2^-). Les enzymes les plus compromis seraient la xanthine oxydase (FRIDOVICH 1970), l'aldéhyde oxydase, les flavines deshydrogénases (FRIDOVICH 1976) et les peroxydases (HALLIWELL 1977). D'autres causes sont responsables de la production de l'ion superoxyde : les irradiations (BENON et al. 1977), l'autoxydation des catécholamines (COHEN et HEIKKILA 1974), des flavines (MICHELSON 1977) et des ferredoxines (MISRA et FRIDOVICH 1971, 1972; BORS et al.1978). Bien que la principale source de production de l'ion superoxyde reste inconnue, BOVERIS (1975, 1977) cite les mitochondries comme source possible de l'ion O_2^-. Dans les cellules cardiaques, les mitochondries génèrent l'ion superoxyde lorsquelles sont en présence de succinate et d'antimycine A (LOSCHEN et al. 1973, 1976). Plus récemment, NOHL et HEGNER (1978) ont mis en évidence la production de ce radical dans des mitochondries de coeur de rat (Figure 28 b). Une grande proportion de l'ion superoxyde (80%) est trappée dans la matrice mitochondriale avant d'être neutralisé ou dismuté spontanément ou par voie enzymatique (FRIDOVICH 1972; NOHL et HEGNER 1978). Mais environ 20% de O_2^- produit dans la mitochondrie peut diffuser dans le cytosol ou interagir avec des composants des membranes mitochondriales .

Les mitochondries, principal site d'utilisation de l'oxygène dans les cellules aérobie, sont succeptibles de produire un autre radical de l'oxygène : l'hydrogène peroxyde H_2O_2 (BOVERIS et CHANCE 1973; NOHL et JORDAN 1980). Le site de production serait localisé entre le site sensible à l'antimycine A et le site sensible à la roténone (figure 29). Cependant, il y a de fortes présomptions pour que la production de H_2O_2 dans les mitochondries soit le résultat d'une dismutation de l'ion superoxyde formé au cours de l'autoxy-

A



B



1 GSH Peroxidase
2 GSH Reductase
3 Transhydrogenase

FIGURE 28

A. Voies d'utilisation de l'oxygène moléculaire.
B. Modèle d'utilisation anormale de l'oxygène par les mitochondries.

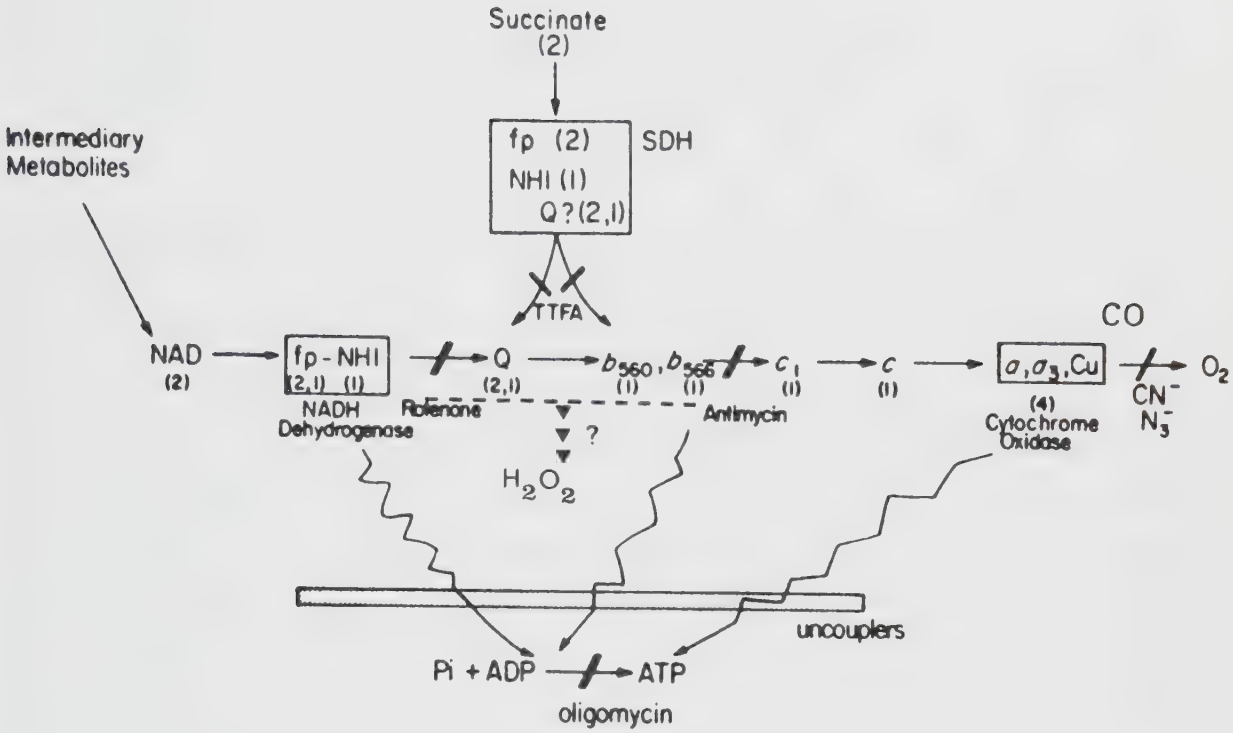


FIGURE 29

Localisation du site possible de production
de l'hydrogène peroxyde (H_2O_2) au niveau de la chaine respiratoire.

dation du cytochrome b_{566} de la chaîne respiratoire (LOSCHEN et al. 1974; NOHL et HEGNER 1978). En dehors des mitochondries, l'hydrogène peroxyde est le résultat d'une réduction divalente de l'oxygène par des oxydases localiséesdans des peroxysomes : urate oxydase ou glycolate oxydase (DE DUVE 1978), ou d'une réduction univalente induite par la xanthine oxydase (FRIDOVICH 1970).

L'hydrogène peroxyde présente une affinité pour des chélateurs métalliques avec lesquels il réagit pour induire la formation du radical hydroxyle $OH^{\cdot}$ ou du singulet oxygène ($1\ \Delta_g O_2$). Le radical hydroxyle est l'un des premiers produits de l'irradiation cellulaire (BENON et al. 1977) et est impliqué dans certains processus inflammatoires (BABIOR 1978). En 1970, BEAUCHAMP et FRIDOVICH proposèrent un mécanisme de la production du radical hydroxyle à partir d'une réaction type HABER WEISS (1934). Cette hypothèse (figure 30) fût infirmée par d'autres auteurs CZAPSKI et ILAN (1978). Il semble probable cependant que le radical hydroxyle soit produit à partir du radical O_2^- et de H_2O_2, en présence de chélateurs métalliques, dans une réaction type FENTON (figure 30) : CZAPSKI (1971), CZAPSKI et ILAN (1978).

Parmi les radicaux de l'oxygène les moins connus, le singulet oxygène est considéré par de nombreux auteurs comme une espèce active de l'oxygène susceptible d'avoir un rôle en biologie (KRINSKI 1977). Bien que les mécanismes aboutissant à sa formation restent très controversés (KHAN 1970, 1976, 1977; KOPPENOL et BUTLER 1977, 1978; DEL MAESTRO 1980), il semble bien que le singulet oxygène soit lié à une réaction de transfert d'un électron de l'ion superoxyde sur un accepteur (KHAN 1970, CZAPSKI et ILAN 1978). Le singulet oxygène correspond à un état excité de l'oxygène ($1\ \Delta_g O_2$) avec réarrangement électronique (figure 26 b).

Ⓐ BEAUCHAMP & FRIDOVICH (1970) : Réaction type Haber-Weiss.

$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^\cdot + OH^-$$
$$\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \lfloor + H^+ \rightarrow H_2O$$

Ⓑ CZAPSKI & ILAN (1978) : Réaction type Fenton.

$$H^+ + H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^\cdot + H_2O$$

Décomposition: $O_2^- + Me^{n+} \longrightarrow Me^{(n-1)+} + O_2$

$$H^+ + H_2O_2 + Me^{(n-1)+} \longrightarrow Me^{n+} + OH^\cdot + H_2O$$

FIGURE 30

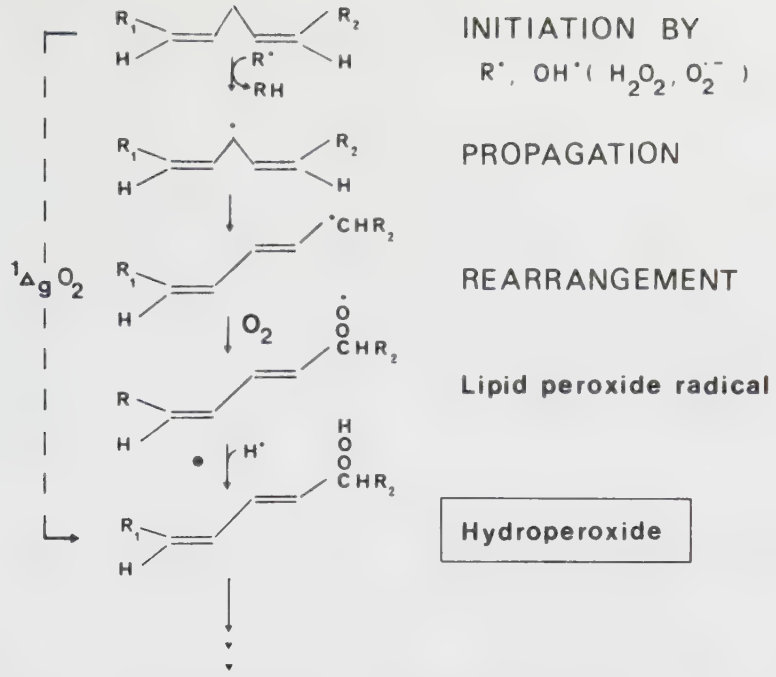
Production du radical hydroxyle ($OH^\cdot$):
présentation de deux hypothèses.

Tous les intermédiaires de la voie univalente de réduction de l'oxygène présentent une réactivité plus ou moins importante, souvent incompatible avec la vie aérobie. Il est de plus en plus admis que les dommages tissulaires provoqués par des concentrations importantes d'oxygène sont en fait induits par des métabolites activés de l'oxygène que nous venons de décrire à savoir : l'ion superoxyde, le radical hydroxyle, l'hydrogène peroxyde ou le singulet oxygène (CLARK et LAMBERTSEN 1971; FRIDOVICH 1978; HALLIWELL 1978; SPIKES et SWARTZ 1978; DEL MAESTRO 1980).

Si ces radicaux sont des intermédiaires chimiques de la cytotoxicité de l'oxygène, ils doivent non seulement être produits dans les systèmes biologiques, mais également être réactifs avec les composants de tels systèmes (protéines, lipides, polysaccharides, acides nucléiques). Les radicaux de l'oxygène peuvent intéragir avec les glycosamines glycanes du milieu extracellulaire et entraîner la dégradation de l'acide hyaluronique (Mc CORD 1974; HALLIWELL 1978; DEL MAESTRO 1979) ou du collagène (GREENWALD et MOY 1979). De telles interactions entraînent une perturbation des caractéristiques structurales et un changement de perméabilité des membranes cellulaires. L'ion superoxyde dénature directement le DNA des cellules eukariotes et empêche la réplication de cette molécule (PRYOR 1976). Les protéines sont également sensibles aux effets des radicaux de l'oxygène. L'inactivation d'enzymes cellulaires serait l'une des conséquences de la cytotoxicité de l'oxygène : HAUGAARD (1968), HALLIWELL (1978).

I-B. 2 - Peroxydations lipidiques.

Les radicaux de l'oxygène induisent des dommages irréversibles des membranes cellulaires car ils présentent une grande réactivité vis à vis des composés hydrophobes de ces membranes : les acides gras insaturés. Cette altération des lipides par des dérivés actifs



• INHIBITION : α TOCOPHEROL

$Lipid\text{-}O_2^{\cdot} + \alpha TH \rightarrow Lipid\text{-}OOH$

$$RH + OH^{\cdot} \rightarrow R^{\cdot} + H_2O$$
$$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$$
$$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$$
$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow R\text{-}R$$
$$R^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR$$
$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} + H^{+} \rightarrow ROH + RO + {}^1O_2$$
$$ROH + RO^{*} + O_2$$
$$RO^{*} + O_2 \longrightarrow RO + {}^1O_2 \rightarrow h\nu$$

FIGURE 31

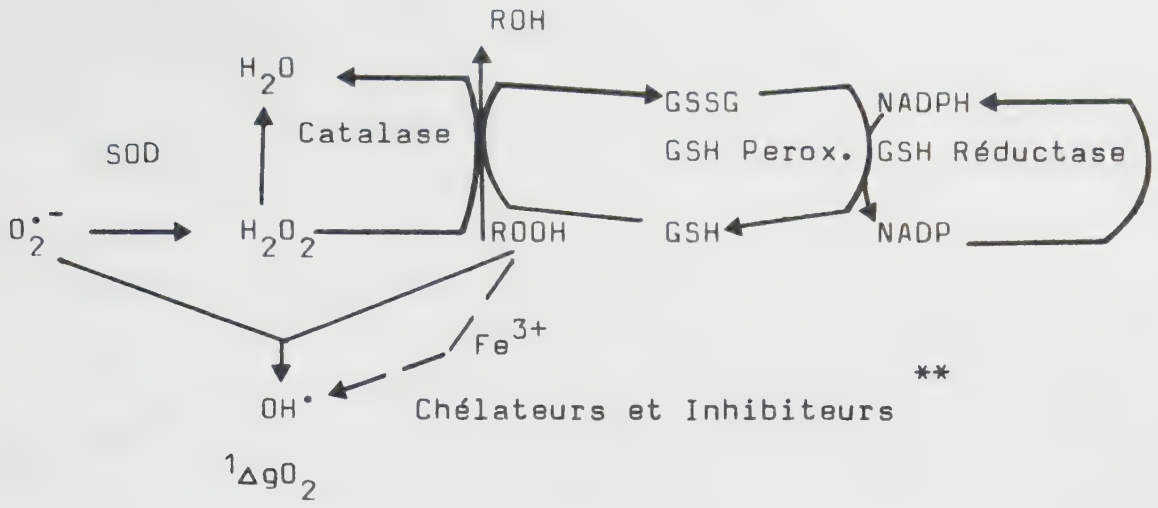
Péroxydation des lipides insaturés: séquence des principales réactions.

de l'oxygène (peroxydation lipidique) entraîne une rupture des membranes plasmatiques ou lysosomales. La peroxydation lipidique est déclenchée par des systèmes enzymatiques connus pour générer des radicaux de l'oxygène (KELLOGG et FRIDOVICH 1977, GOLDSTEIN et WEISSMANN 1977; THOMAS et al. 1978; CADENAS et al. 1981; ERNSTER et al. 1982).

La figure 31 donne une représentation schématique du mécanisme, le plus souvent admis, de la peroxydation des acides gras insaturés. Le radical $OH^{\cdot}$ est très réactif vis à vis des lipides et favorise la formation de radicaux lipides peroxydes ($ROO^{\cdot}$), de lipides hydroperoxydes (ROOH) et de produits de fragmentation comme le malonaldéhyde (KELLOGG et FRIDOVICH 1977). Bien que l'ion superoxyde ne soit généralement pas considéré comme oxydant des lipides insaturés, THOMAS et al. (1978) ont montré que ce radical peut réagir avec les lipides hydroperoxydes pour former le radical alkoxy ($RO^{\cdot}$). Ce radical alimente à son tour la chaine des peroxydations lipidiques. Le fer prend également une part importante dans la propagation des peroxydations lipidiques (AUST et SVIGEN, 1982). En dehors des conséquences majeures de ces peroxydations sur l'intégrité des membranes cellulaires (FONG et al. 1973), certains peroxydes lipidiques auraient un rôle en carcinogénèse (PETKAU 1980) ou dans l'altération des perméabilités vasculaires (DEL MAESTRO 1980).

I-C. MECANISMES CONTROLANT LA CYTOTOXICITE DE L'OXYGENE.

Que ce soit par l'intermédiaire des radicaux de l'oxygène ou par les produits de peroxydations, la toxicité de l'oxygène moléculaire a pour conséquence l'altération le plus souvent irréversible, de l'intégrité cellulaire. Pour limiter ou contrôler l'attaque peroxydative de l'oxygène, la cellule aérobie met en jeu des systèmes complexes de protection. Ces systèmes sont de nature



Superoxyde dismutase

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

GSH Peroxydase

$$2\ GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2\ H_2O$$

$$H_2O_2 + 2Cyt\ C^{2+} + 2H^+ \longrightarrow 2\ H_2O + 2Cyt\ C^{3+}$$

Cyt C. Peroxydase

$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Catalase

$$ROOH + 2\ GSH \longrightarrow GSSG + ROH + H_2O$$

GSH Peroxydase

$$ROO^{\cdot} + \alpha TH \longrightarrow ROOH + \alpha T^{\cdot}$$

$$ROO^{\cdot} + \alpha T^{\cdot} \longrightarrow ROOH + \alpha TQ$$

** Termes traduits de l'anglais: "Scavenger , quencher".

FIGURE 32

Systèmes de protection cellulaire contre la toxicité de l'oxygène .

hydrophobe, hydrophile ou enzymatique.

La cytochrome oxydase est l'un des systèmes enzymatique les plus importants car, en catalysant la réduction tétravalente de l'oxygène, elle empêche la production de radicaux de l'oxygène dans le milieu cellulaire (ANTONINI et al. 1970). La superoxyde dismutase (SOD) est l'enzyme clé de la protection cellulaire contre les effets toxiques de l'oxygène (Mc CORD et FRIDOVICH 1969; FRIDOVICH et al. 1976, 1978). Cette enzyme catalyse la dismutation de l'ion superoxyde en hydrogène peroxyde moins toxique pour la cellule (figure 32). Les différents types de superoxyde dismutase sont déterminés par la nature du métal inclu dans l'hème de l'enzyme. Dans le cytoplasme des cellules eukaryotes, les SOD renferment soit un complexe cuivre-zinc, soit du manganèse (Mc CORD et al. 1977). En revanche, les mitochondries contiennent une superoxyde dismutase à manganèse (WEISIGER et FRIDOVICH 1973). En catalysant la dismutation de l'ion superoxyde, la superoxyde dismutase neutralise l'interaction de O_2^- avec les lipides membranaires et s'avère être un puissant inhibiteur des peroxydations lipidiques dans la mitochondrie (ZIMMERMAN et al. 1973) ou dans les espaces intramembranaires (FRIDOVICH 1975, 1978 a, b; DEL MAESTRO 1979).

Les autres systèmes enzymatiques de protection contre la toxicité de l'oxygène sont représentés par les catalases et les peroxydases. Ces enzymes transforment l'hydrogène peroxyde en eau et en oxygène (figure 32). Les catalases sont localisées principalement dans les peroxisomes, mais les mitochondries peuvent en contenir en plus ou moins grande quantité (HALLIWELL 1974, 1977). NOHL et HEGNER (1978) ont mis en évidence la présence d'une catalase dans la matrice mitochondriale du coeur de rat (figure 28 b).

Les peroxydases, et plus précisément la glutathion peroxydase, apparaissent être des enzymes à grande affinité pour l'hydrogène peroxyde (LITTLE et O'BRIEN 1968, AUST et SVINGEN 1982).

Cette enzyme, qui utilise le glutathion réduit (GSH) comme coenzyme, a une activité plus importante que la catalase au niveau du muscle cardiaque (LAWRENCE et BURK 1978). En réagissant avec une grande variété d'hydroperoxydes, la glutathion peroxydase est une enzyme importante dans l'inhibition de la peroxydation des lipides (LITTLE et O'BRIEN 1968, FLOHE 1982).

La cellule aérobie possède également un système de protection hydrophile contre la toxicité de l'oxygène : le glutathion réduit (PRYOR 1976; KOSOWER et KOSOWER 1976). Ce tripeptide renferme un groupement thiol qui le rend plus disponible vis à vis de l'oxygène que les autres enzymes à groupement SH (HALLIWELL 1978). De ce fait, le glutathion réduit s'oxyde en GSSG (figure 32) et empêche l'inactivation de certaines enzymes par l'oxygène (HAUGAARD 1968; HALLIWELL 1978). La reconversion du glutathion oxydé en forme réduite est assurée par une glutathion réductase NADPH dépendante (HALLIWELL 1978; CHANCE et al. 1979). La constante d'équilibre de la réaction de réduction du glutathion est en faveur d'un haut rapport GSH/GSSG dans les cellules (JOCELYN 1972; TIETZE 1969; HALLIWELL et FOYER 1978). D'autres substances biologiques semblent prendre un rôle plus ou moins important dans la protection des cellules contre les effets toxiques de l'oxygène. Le cholestérol ou la Vitamine E (α tocophérol) sont susceptibles de s'incorporer dans les membranes cellulaires et de protéger les acides gras contre une attaque peroxydative du singulet oxygène ou du radical hydroxyle (DEMOPOULOS et al. 1972; DEL MAESTRO 1980).

CHAPITRE II

PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX.

II-A. TECHNIQUE DE PERFUSION.

L'ensemble des expériences a été réalisé avec des rats mâles, de souche WISTAR, dont le poids est compris entre 300 et 350 grammes.

Les conditions de prélèvement du coeur sont analogues à celles décrites dans le chapitre II de la première partie.
Après insertion d'une canule dans le segment aortique, l'ensemble coeur-canule est placé sur le système de perfusion. L'une des voies du circuit est alors ouverte de manière à perfuser immédiatement le coeur par voie aortique rétrograde sous une pression constante de 70 mm Hg.

Le système de perfusion est constitué de quatre circuits disposés en parallèle et interconnectés à la partie supérieure de la canule aortique. La sélection d'un circuit se fait à ce niveau à l'aide d'un système multivoies. L'espace mort compris entre le sélecteur et les valves sigmoïdes est limité à 0,5 ml, de sorte que les mélanges de perfusat soient négligeables. Chaque circuit est constitué d'un réservoir et d'une tubulure inox de 2 mm de diamètre

intérieur. L'étanchéité des connections est assurée par des joints en matière synthétique. L'ensemble de l'appareillage est incorporé dans une enceinte thermostatée à 37.5° ± 0.2° C. Durant les perfusions, le coeur est entouré d'une enceinte utilisée pour le recueil du perfusat. Cette enceinte est remplie d'une atmosphère saturée en vapeur d'eau.

Le milieu de perfusion utilisé en début d'expérience est une solution électrolytique (NaCl : 115 mM, Kel : 5.7 mM, $MgSo_4$: 0.5 mM, NaH_2PO_4 : 1.18 mM, $NaHCO_3$: 27 mM, $CaCl_2$: 2.5 mM, glucose : 11 mM). Cette solution est oxygénée par un mélange O_2/CO_2 (95%/5%) assurant un pH de 7.4 ± 0.2 et une PO_2 à l'entrée de la canule aortique de 650 ± 20 mm Hg.

II-B. DECOURS DES PERFUSIONS.

Quelque soit l'expérience, chaque coeur est soumis à une perfusion de stabilisation de 15 minutes de manière à obtenir une stabilité du débit coronaire, de la fréquence cardiaque et d'atteindre une température homogène sur l'ensemble de la préparation.

Les coeurs sont ensuite maintenus dans des conditions aérobies ou anaérobies (figure 33). Ces phases de perfusion sont de durées variables (15, 30 ou 60 minutes) et sont effectuées sur des coeurs arrêtés par une solution électrolytique hyperpotassique dépourvue de substrat exogène (NaCl 106 mM, KCl 18 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, $MgSO_4$ 0.5 mM, NaH_2PO_4 1.18 mM, $NaHCO_3$ 27 mM).

L'arrêt de la fonction contractile permet d'obtenir des préparations reproductibles en évitant les artefacts liés aux troubles du rythme, principalement au cours des hypoxies.

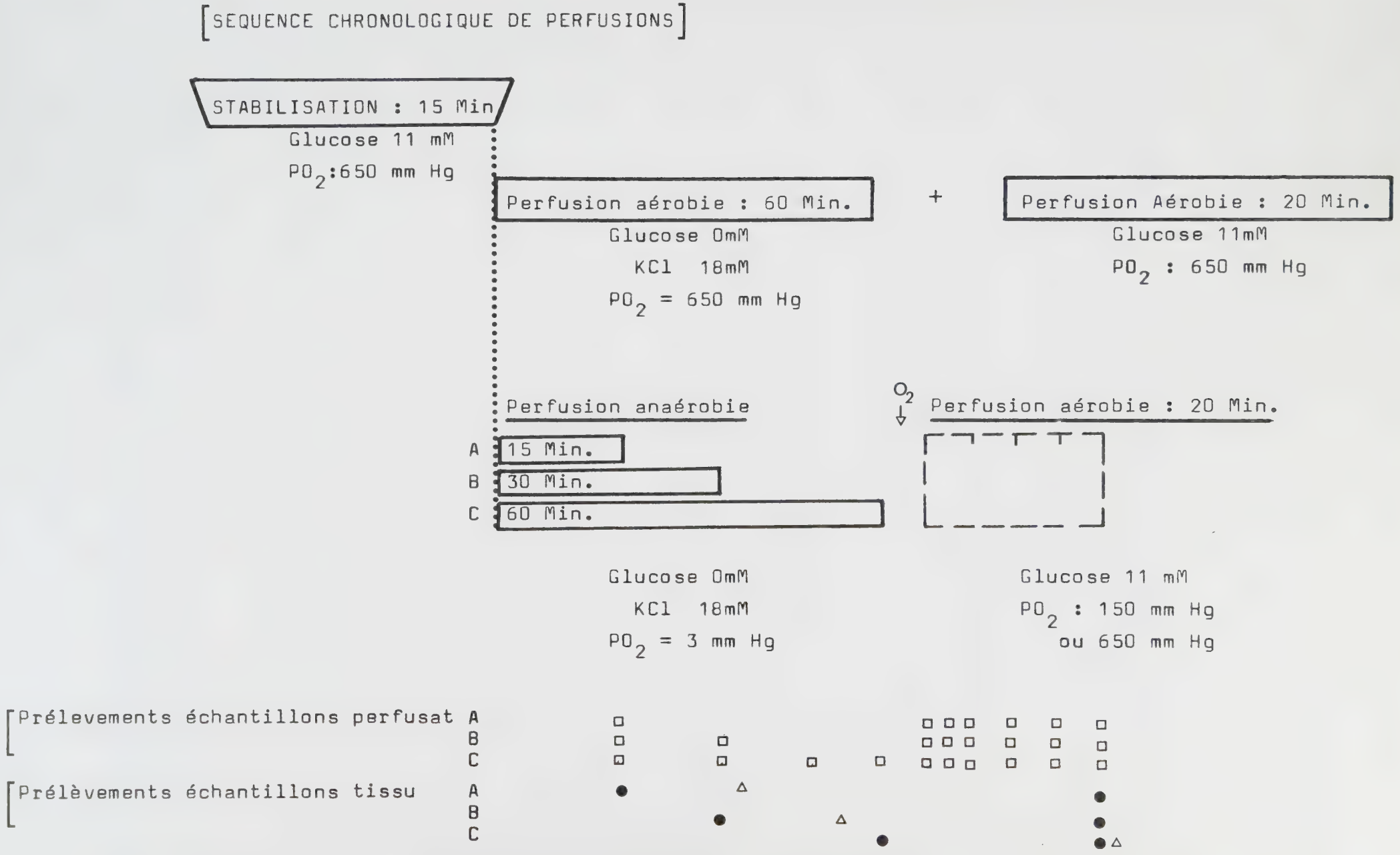


FIGURE 33 : Protocoles de perfusion et de prélèvements des échantillons .

En aérobie, le milieu de perfusion est équilibré avec un mélange $O_2/N_2/CO_2$ permettant d'obtenir une PO_2 de 150 ± 10 mm Hg ou de 650 ± 20 mm Hg. Les conditions hypoxiques (PO_2 < 3 mm Hg) sont effectuées avec un mélange gazeux N_2/CO_2 (95%, 5%).

La réoxygénation des coeurs hypoxiques est effectuée sur une période de 20 minutes. Les PO_2 de réoxygénation sont de 10, 150 ou 650 mm Hg. Le milieu de perfusion contient du glucose (11 mM) et une concentration en potassium normale (5.9 mM).

II-C. ECHANTILLONNAGES ET TECHNIQUES DE DOSAGES.

Les échantillons de perfusat et tissulaires sont prélevés selon un protocole décrit dans la figure 33. Ces échantillons sont maintenus à 4° C avant et pendant les différents traitements.

* Altérations cellulaires : détermination des activités enzymatiques. Pour évaluer de degré des altérations cellulaires, nous avons utilisé des marqueurs enzymatiques qui peuvent être libérés dans le compartiment vasculaire lorsque les dommages apparaissent. (HEARSE 1977). Dans cette étude la LDH et la CK sont dosées selon les techniques de WROBLEWSKI et al. (1955); SIEGEL et COHEN (1974).

Les activités enzymatiques sont exprimées en unités internationales (UI) à partir de mesures effectuées à 25° C sur un spectrophotomètre PERKIN-ELMER 551 équipé de cuves thermostatées, d'un double faisceaux et d'un calculateur d'activités enzymatiques PERKIN-ELMER 5-100.

Les activités enzymatiques sont calculées au niveau de la partie linéaire de la cinétique enzymatique. Les techniques de dosage reposent sur la transformation de nucléotides pyrimidiques en forme

réduite ou oxydée, facilement repérables par la différence de leur spectre d'absorption. Les variations de densités optiques liées à la disparition ou à l'apparition d'un coenzyme réduit (NADH) sont converties en activités enzymatiques par l'intermédiaire d'un facteur (F) qui dépend des conditions de dosage. La loi de BEER-LAMBERT permet de relier la variation temporelle de la densité optique à une activité enzymatique :

$$\text{Activité enzymatique (m IU/ml)} = \frac{V}{v.\ d.\ \xi} \cdot \Delta E$$

$$\text{avec } F = \frac{V}{v.\ d.\ \xi}$$

ξ = coefficient d'extraction moléculaire du NAD/NADH à 334 nm,
= 6.1 cm^2/ u mole.
V = volume total de la cuve (0.625 ml)
v = volume de l'échantillon (0.025 ml)
ΔE = variation de densité optique/minute.

Les quantités d'enzymes libérées sont obtenues en multipliant les activités enzymatiques (mIU/ml) par le débit coronaire (ml/min.). Les résultats sont exprimés en mIU/min/gramme de poids frais.

Les réactifs intervenant dans les dosages de la LDH ou de la CK sont préparés à partir de coffrets BOEHRINGER MANNHEIM GmBH.

Dans certaines expériences, la catalase libérée dans le milieu de perfusion a été dosée selon la technique de AEBI à 240 nm, 25°C et à un pH de 7.2.

$$\text{Catalase} + H_2O_2 \longrightarrow H_2O + 1/2\ O_2.$$

L'activité de la catalase présente dans l'échantillon est déterminée à partir de l'étude de la disparition de H_2O_2 à 240 nm. Cette réaction obéit à une cinétique du premier ordre dont la constante de vitesse "k" est définie par l'équation suivante :

$$k = \frac{1}{\Delta t} \; 2{,}3 \log \left[\frac{E_1}{E_2}\right]$$

Dans notre étude, les activités de la catalase seront exprimées en unités BERGMEYER (taux d'enzyme qui produit 1/2 mole d'oxygène en 100 secondes et à 25°C). L'unité BERGMEYER est définie par la formule suivante :

$$1 \text{ unité BERGMEYER} = \frac{100}{\tau} = \frac{100.\ k}{\text{Log } 2} = \frac{k}{6.93\ 10^{-3}}$$

$$= \frac{2.3}{t.6.93\ 10^{-3}} \log \left[\frac{E1}{E_2}\right]$$

E_1 et E_2 sont les densités optiques avant et après le dosage de la catalase. Afin d'éviter toute inhibition de la catalase par le complexe catalase -H_2O_2, nous avons utilisé une concentration finale de H_2O_2 égale à 10 mM.

* Les malonaldéhydes, produits terminaux de la peroxydation des lipides, sont dosés dans le perfusat et les échantillons tissulaires selon la technique de BERNHEIM et al. (1948). Le protocole de dosage est résumé dans la figure 34. Les mesures sont effectuées à 25°C, et à 535 nm avec ξ_{535} égal à 156 l $mmol^{-1} cm^{-1}$ (SINNHUBER et YU 1958). Pour chaque échantillon, une cuve témoin (blanc) est utilisée et placée sur l'un des faisceaux du spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en nanomoles/ min. ou en nanomoles/mg protéine.

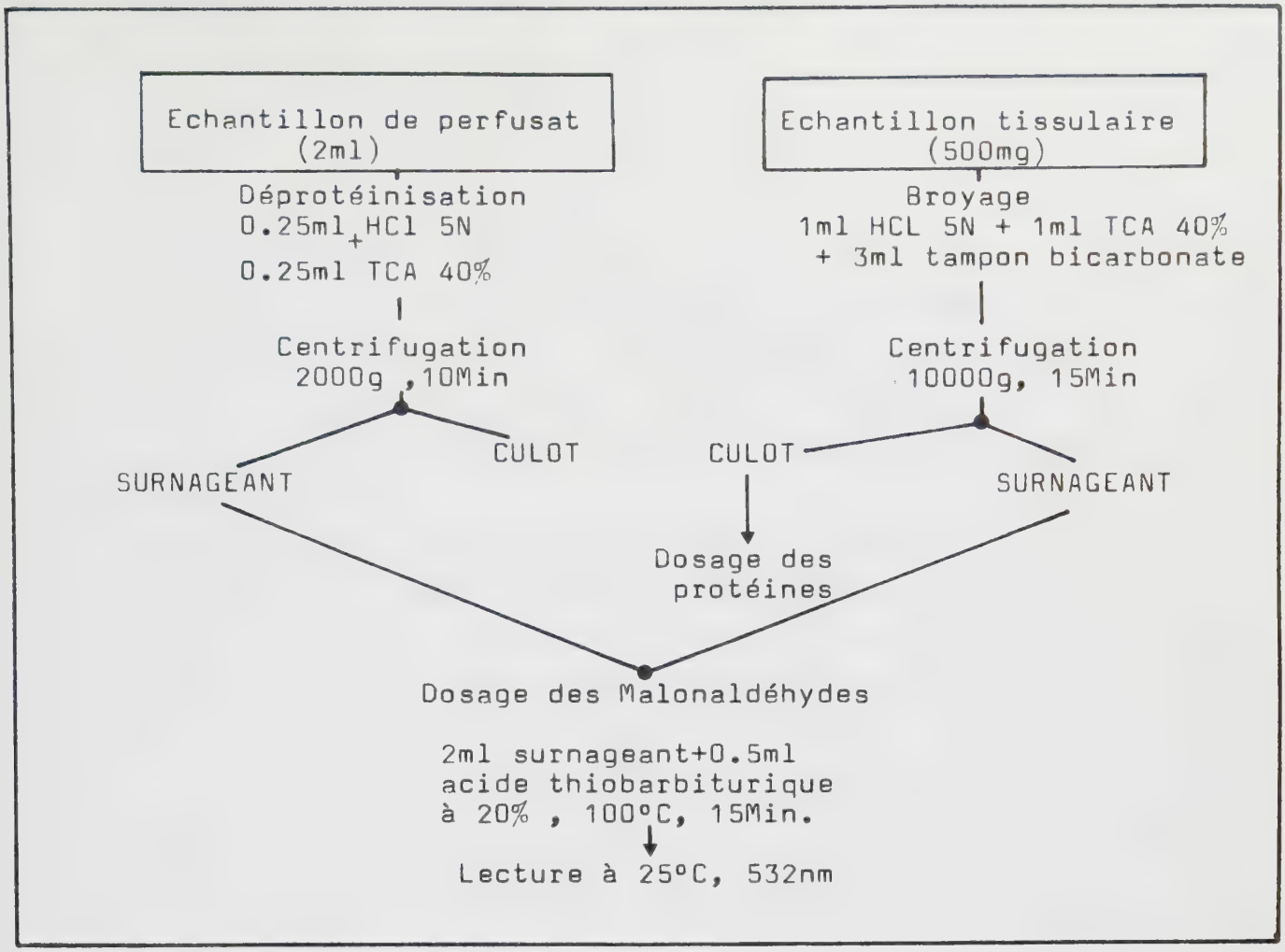


FIGURE 34

Traitements des échantillons pour le dosage de malonaldéhyde.

* Mitochondries isolées :

A la fin de la période de perfusion, les coeurs sont découpés en fragments et plongés dans un milieu d'isolement (MI) à 4°C.

Les populations de mitochondries isolées sont obtenues à partir de la technique de VON KORFF (1965) modifiée par SORDHAL et SCHWARTZ (1967).
Le protocole général d'isolement est représenté sur la figure 35. Les différentes phases d'isolement sont effectuées à 4°C et ne dépassent pas 1 h 30 de durée. Le milieu d'isolement a la composition suivante : KCl (0.18 M), EDTA (0.01 M), Albumine bovine fraction V (5 °/$_{oo}$). Le pH est ajusté à 7.42.

Avant les mesures en polarographie, les culots de mitochondries sont remis en suspension dans le milieu d'isolement, à la concentration finale de 20 mg de protéines mitochondriales/ml.

Les mesures de la fonction mitochondriale sont effectuées sur un polarographe YSI 53 munie d'une électrode à oxygène type CLARK et d'une cuve d'incubation de volume compris entre 1.5 et 2.2 ml (figure 36). L'ensemble du système cuve-électrode est maintenu dans une enceinte à 30°C. Le milieu d'incubation à la composition suivante :

Sucrose (0.25 M), K_2HPO_4 (10 mM), Tampon tris-HCl pH 7.4.

Le substrat utilisé dans cette étude est du glutamate de sodium à la concentration finale 10 mM. Le volume de la suspension mitochondriale introduit dans la cuve donne une concentration finale de 1 à 1.5 mg de protéine mitochondriale par ml.

Les différents paramètres de la fonction mitochondriale sont calculés à partir d'enregistrements graphiques :

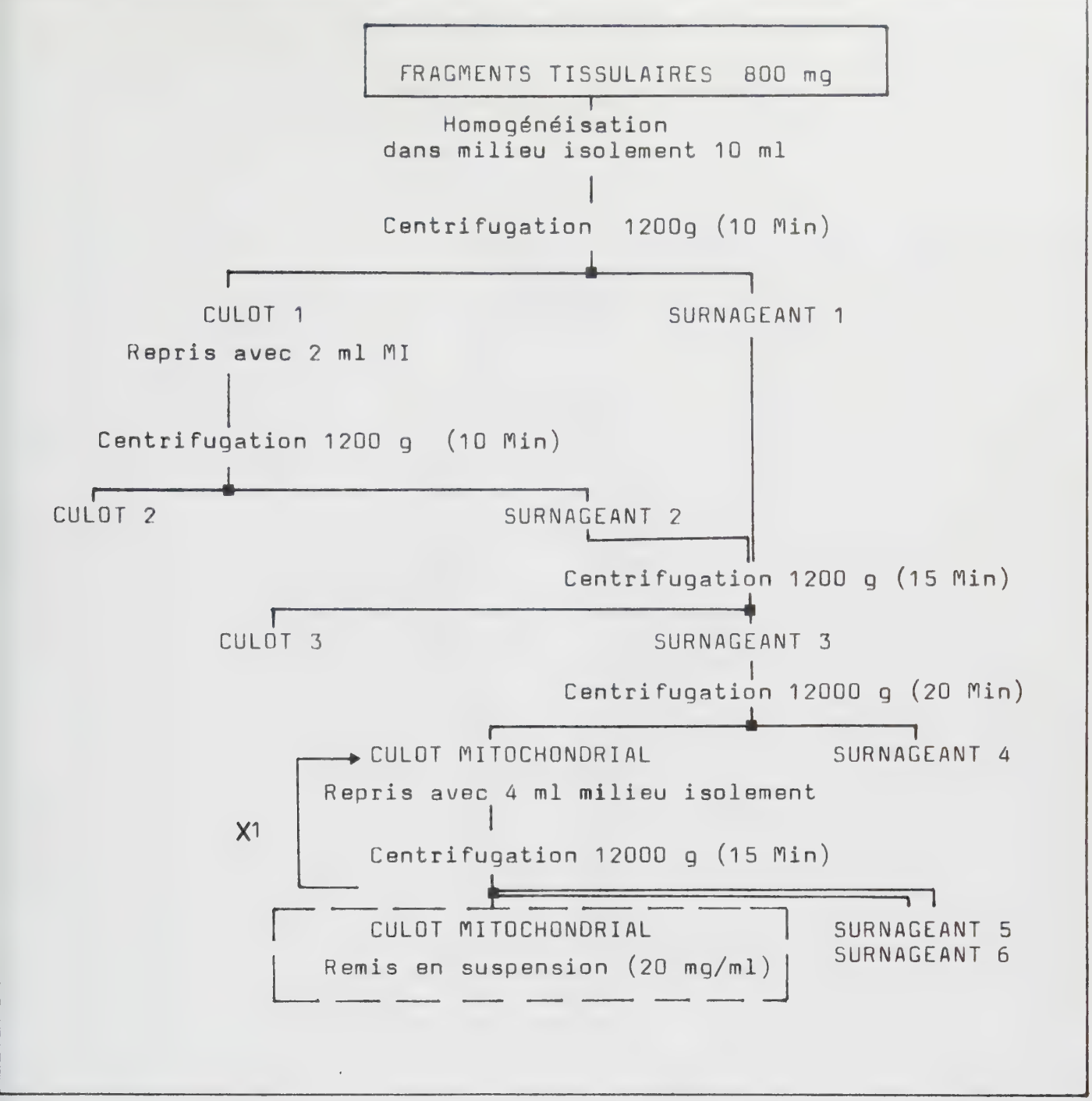


FIGURE 35

Protocole d'isolement des mitochondries.

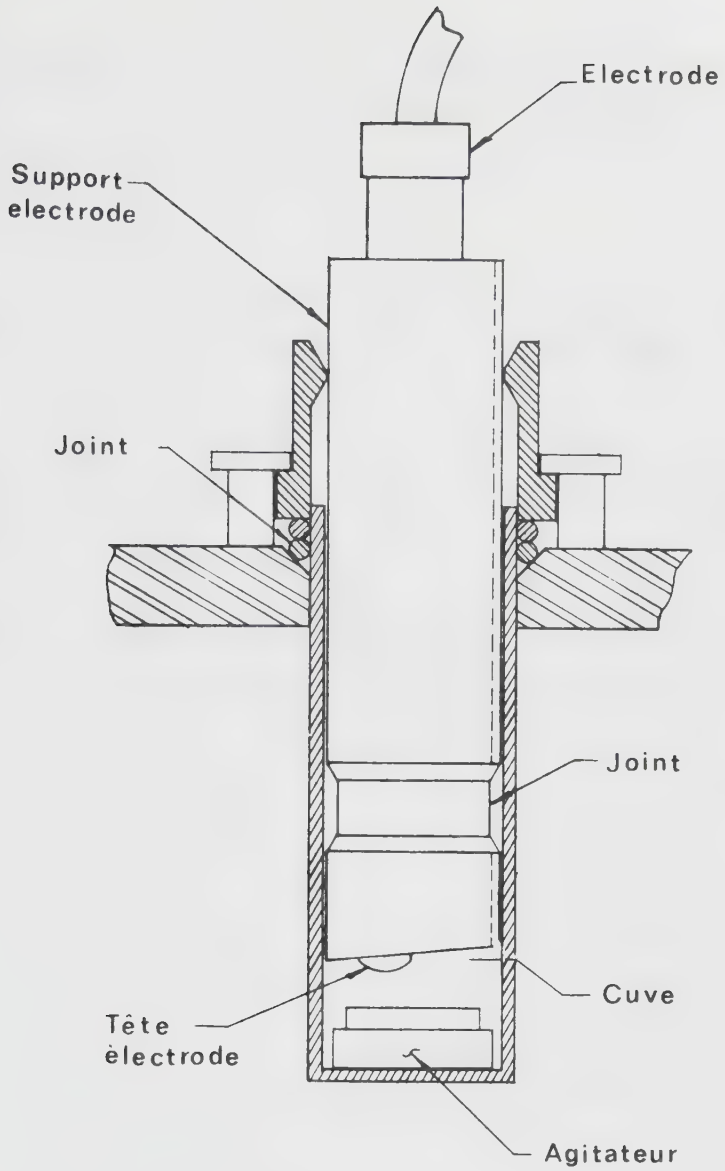


FIGURE 36

Cuve et électrode type "Clark" pour
étude de la fonction mitochondriale.

- Indice de contrôle respiratoire (RCI) : rapport entre la quantité d'oxygène utilisée en présence d'ADP (stade 3) et la quantité d'oxygène utilisée en fin de phosphorylation (stade 4).

- ADP/O (P/O) : rapport entre le nombre de n.moles d'ATP produit et le nombre d'atomes d'oxygène utilisé.

- QO_2 stade 3 ou stade 4 : nombre d'atomes d'oxygène utilisé pendant le stade 3 ou le stade 4. Le stade 3 est déclenché par l'ADP (560 n.moles).

Les réactifs chimiques utilisés sont obtenus chez SIGMA et MERCK. Toutes les solutions sont refaites pour chaque expérience.

CHAPITRE III

RÉSULTATS.

CATECHOLAMINES ENDOGENES ET HYPOXIE DU MYOCARDE; CONSEQUENCES SUR LA CYTOTOXICITE DE LA REOXYGENATION *

III-A. INTRODUCTION

Le muscle cardiaque est un organe riche en catécholamines et principalement en noradrénaline. Cette synthèse de noradrénaline cardiaque est située au niveau de l'organe même (KOPIN et GORDON 1963). En revanche, l'adrénaline endogène serait synthétisée par un autre organe, le muscle cardiaque étant susceptible de capter l'adrénaline circulante.

Les catécholamines endogènes sont stockées dans les vésicules ou particules granulaires. Ces particules pourraient intervenir dans la synthèse de la noradrénaline (STJARNE 1966) principalement localisée dans la région du noeud sinoauriculaire : SHINDER et al. (1968). L'adrénaline est synthétisée à partir d'un précurseur,

* Les résultats ont fait l'objet de deux publications et ont été présentés dans deux thèses doctorat 3ème cycle (GAUDUEL 1978; BEGUE 1979).

la noradrénaline, par méthylation de celle-ci sous l'influence de la S-adénosyl méthionine. Cette réaction est catalysée par le phényl-éthanolamine-N méthyl-transférase.

Le muscle cardiaque peut libérer ses catécholamines sous l'influence de certains stress. Cependant, une grande partie des catécholamines libérés est recaptée par les granules de stockage. Pour le coeur de rat, le temps de renouvellement de la noradrénaline, évalué par une méthode isotopique, est de 10 heures (BRALET et al. 1971).

Le coeur isolé de rat, perfusé sous substrat pendant deux heures, présente une défaillance mécanique accompagnée d'une réduction du stock endogène de noradrénaline. La fraction soluble augmente dans le myocarde, alors que la fraction granulaire diminue (DHALLA et al. 1971). WOLLENBERGER et SHAHAB (1965) observent qu'un arrêt de la perfusion coronaire est responsable d'une décharge importante de catécholamines par le myocarde. Il est concevable que l'accumulation d'acide lactique ou d'autres métabolites observés au cours d'une hypoxie ou d'une ischémie, contribue, par l'augmentation de la concentration en ions H^+, à la libération de la noradrénaline par le muscle cardiaque (POTTER et AXELROD 1963).

En provoquant une hypoxie sur l'animal entier, NEJAD et al. (1967) observent, une vingtaine d'heures après le début du stress, une libération de catécholamines dans la circulation sanguine. OPIE (1975) observe, une heure après le début d'un infarctus du myocarde, une libération normale de catécholamines dans le lit vasculaire.

Les effets stimulant des catécholamines passent par une activation du système membranaire adénylcyclase qui entraîne la formation d'AMP_c (SUTHERLAND et al. 1957; COOK et al. 1957; NAMM et al. 1968). Ce composé joue un rôle très important dans le contrôle de

l'activité de la glycogène phosphorylase (MAYER et al. 1967) et du métabolisme lipidique. Certains lipases, dont le lipase kinase, pourraient être activés par le système adénylcyclase.
Les catécholamines peuvent également agir sur les propriétés des membranes cellulaires. De nombreux travaux montrent que des injections de catécholamines chez les animaux, provoquent la libération d'enzymes cellulaires dans la circulation générale (HIGHMAN et al. 1959, 1965; SELMECI et al. 1968; SCHENK et al. 1966). Il a été formulé une hypothèse selon laquelle une modification de la perméabilité des membranes cellulaires serait à l'origine des libérations d'enzymes. Certains auteurs ont décrit l'apparition de lésions et nécroses du myocarde après injection de catécholamines (RAAB et al. 1963; FLECKENSTEIN 1971).

Dans ce sous chapitre III A nous présentons les résultats d'une étude destinée à préciser le rôle des catécholamines endogènes (adrénaline et noradrénaline) dans le développement des altérations cellulaires induits au cours de l'hypoxie du myocarde. L'effet de ces amines sur la cytotoxicité de la réoxygénation a également été précisé.
Cette expérimentation a été réalisée en collaboration avec J. de LEIRIS, D. FEUVRAY et J.M. BEGUE, Laboratoire de physiologie comparée et de physiologie cellulaire, Centre d'ORSAY, Université PARIS XI.

Les études sont effectuées sur des coeurs de rat soumis à des hypoxies de longues durées. La variation des taux cellulaires d'adrénaline et de noradrénaline a été observée sur les coeurs hypoxiques et sur des coeurs réoxygénés en présence d'une PO_2 élevée. Nous avons utilisé des traitements pharmacologiques qui permettent de dépléter le myocarde du stock de catécholamines endogènes, de bloquer les récepteurs adrénergiques $\beta 1$ ou d'agir sur la fraction tyramino-sensible des catécholamines tissulaires. Le degré des

altérations cellulaires induits par l'hypoxie et la réoxygénation est objectivé par l'étude de la libération d'une enzyme cellulaire : la LDH. Une analyse de certains paramètres du métabolisme énergétique a été effectuée afin d'étayer une hypothèse sur le mode d'action des catécholamines au cours de l'hypoxie myocardique.

Journal of Molecular and Cellular Cardiology (1979) **11**, 717–731

Deleterious Effects of Endogenous Catecholamines on Hypoxic Myocardial Cells Following Reoxygenation

YANN GAUDUEL*, HRAYR S. KARAGUEUZIAN† AND JOËL DE LEIRIS‡§

Laboratoire de Physiologie comparée et de Physiologie cellulaire associé au CNRS, Université de Paris-Sud, 91405 *Orsay, France*

(*Received* 3 *November* 1978, *accepted in revised form* 15 *December* 1978)

Y. GAUDUEL, H. S. KARAGUEUZIAN AND J. DE LEIRIS. Deleterious Effects of Endogenous Catecholamines on Hypoxic Myocardial Cells Following Reoxygenation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (1979) **11**, 717–731. The ability of endogenous myocardial catecholamines to modify biochemical alterations during conditions of severe myocardial hypoxia and subsequent reoxygenation was studied in isolated, Langendorff-perfused, potassium-arrested, rat heart preparations. Hearts depleted of endogenous catecholamines (induced by reserpine pretreatment) exhibited higher levels of ATP, creatine phosphate and glycogen and a lesser amount of lactate dehydrogenase release following 100 min of hypoxia (95% N_2 : 5% CO_2). The large amount of myocardial lactate dehydrogenase release normally present during reoxygenation of the hypoxic heart (oxygen paradox) was abolished by reserpine pretreatment. These biochemical changes in reserpinized hearts reflect a diminution of myocardial cell damage. Glucagon administration reversed all the beneficial effects of catecholamine depletion in conditions of both severe hypoxia and reoxygenation.

It is concluded that endogenous myocardial catecholamines exert harmful effects on the evolution of hypoxic myocardial cell damage in the rat.

KEY WORDS: Hypoxia; Catecholamines; Isolated rat heart; Lactate dehydrogenase release; Reoxygenation; Reserpine; Glucagon; ATP; Creatine phosphate; Lactate; Glycogen.

1. Introduction

It has been shown in isolated perfused hearts, arrested by high potassium medium, that hypoxia induced myocardial cell damage including (i) large release of cytoplasmic and plasma membrane marker enzymes [*11*], (ii) rapid depletion in cellular levels of adenosine triphosphate (ATP), creatine phosphate (CP) and glycogen [*13*], and (iii) ultrastructural changes [*4*]. The extent of hypoxia-induced myocardial cellular damage was increased by increasing the duration of the hypoxic period [*11*] or by suddenly reoxygenating the hypoxic heart [*4*, *11*]. In addition,

* This work was submitted as a partial fulfillment for the degree of Doctorat de Specialité by Y.G.

† H.S.K. is a recipient of a grant in-aid from Fondation Simone et Cino del Duca, Paris, France.

‡ Reprint requests and correspondence to Dr J. de Leiris, Bat. 443, Centre Universitaire, 91405-Orsay, France.

§ Present address: Laboratoire de Physiologie Animale, USMG, BP 53X, 38041—Grenoble, France.

0022-2828/79/080717 + 15 $02.00/0 © 1979 Academic Press Inc. (London) Limited

it has been reported that hypoxia induced a release of endogenous catecholamines from isolated hearts [*28*].

The purpose of the present study was to evaluate whether or not such a release of endogenous catecholamines might be involved in the development of hypoxia-induced tissue damage. Therefore, we studied the effects of severely hypoxic perfusions on hearts isolated from (i) normal untreated rats and (ii) from rats in which endogenous catecholamine levels have been reduced by reserpine pre-treatment. Since glucagon exhibits adrenaline-like effects [*3*], we also studied the effect of hypoxia in reserpinized hearts in the presence of glucagon.

2. Materials and Methods

Male rats (body weight 330 ± 55 g, $n = 135$, mean ± S.D.) of the Wistar strain, fed *ad libitum*, were used.

Perfusion technique

The rats were anesthetized with diethylether inhalation. Heparine was injected (100 iu) into the femoral vein to prevent coagulation of the blood. The heart (wet weight 1.08 ± 0.11 g, mean ± S.D.) was then rapidly excised by the technique described by Neely *et al.* [*21*], arrested in ice-cold perfusion fluid and mounted by the aorta on a stainless steel cannula and perfused in retrograde manner by the Langendorff technique [*16*] in a non-recirculating fashion at 10 kPa at 37°C. The pulmonary artery was incised to allow complete coronary drainage.

Perfusion medium

Krebs-Henseleit bicarbonate buffer pH 7.4 was the standard perfusion fluid. During hypoxic perfusion the heart was K^+ arrested by increasing the concentration of potassium in the perfusion fluid from 5.6 to 16 mM with a corresponding decrease in Na^+ concentration. The elevation of the potassium concentration during all experimental conditions prevented the occurrence of hypoxia-induced cardiac arrhythmias and irregular beating. This provided more reproducible experimental conditions [*11*]. Before use, the perfusion fluid was filtered through a cellulose acetate filter of pore size 0.8 μm (Millipore Ltd).

The perfusion fluid was maintained at 37°C and during the initial aerobic or reoxygenation phases the fluid was equilibrated with $O_2 + CO_2$ (95:5, aortic oxygen partial pressure was approximately 580 mmHg). In hypoxic phase the fluid was equilibrated with $N_2 + CO_2$ (95:5, aortic oxygen partial pressure was less than 6 mmHg). Atmospheric gas contamination of the heart was prevented by using glass connections and enclosing the heart in a water-jacketed (37°C)

chamber which was continuously gassed with the same gas mixture as that used for the perfusion fluid.

Perfusion time sequence

Immediately after mounting, the heart was perfused (standing perfusion fluid plus 11 mM glucose) aerobically for a 10 min wash-out and "equilibration" period. Hearts were then exposed to 100 min non-recirculating Langendorff hypoxic perfusion. After this hypoxic period, preparations were reoxygenated and the effects of reoxygenation were followed for 20 min.

During the experimental period coronary flow was monitored by timed collection and at the end of each experiment the heart was blotted and weighed.

Analytical procedure

Samples of the coronary effluent were collected at specified intervals and analyzed for lactate dehydrogenase (LDH) activity and lactate production. LDH activity released into the coronary effluent was measured by the spectrophotometric method of Wroblewski and La Due [*29*] using an Eppendorff 6120 photometer. LDH activity in the perfusate is expressed as IU released/min or IU/ml or IU/g wet heart weight. Lactate in the perfusate was measured according to the method of Gutmann and Wahlefeld [*9*] and expressed as μmol/g dry heart weight.

In experiments in which tissue ATP, CP and protein contents were measured the whole ventricular mass was frozen between stainless steel tongs [*27*] cooled to the temperature of liquid nitrogen. The frozen muscle was then powdered in a mortar chilled by liquid nitrogen and deproteinized in a cold 0.66 N perchloric acid solution. After centrifugation, ATP and CP were determined in the supernatant by standard enzymatic procedures [*14*, *15*] and proteins were assayed in the pellet according to the biuret method [*8*]. Tissue content of ATP and CP was expressed as nmol/mg protein. Tissue glycogen was determined on frozen hearts according to the method of Good *et al.* [*7*] and expressed as μmol glucose equivalent/g wet heart weight.

For the determination of the total activity of LDH in fresh myocardium an extraction procedure based on that described by Sobel *et al.* [*24*] was used.

Tissue noradrenaline and adrenaline content was measured according to the fluorometric method of von Euler and Lishajko [*25*] and espressed as μg/g wet heart weight.

Drug treatment

Reserpine (Serpasil, Ciba-Geigy Ltd, Basel) was administered i.p. at 1.5 mg/kg 48 h and 5 mg/kg 24 h respectively prior to the excision of the heart. Glucagon

(NIP, Paris) was pulse-administered through the aortic cannula at 0.5 μg every 10 min during the entire hypoxic period (total injection 5 μg).

Analysis of data

Results are given as mean ± S.E.M. (unless otherwise stated). P values were calculated by an unpaired Student's t-test. $P \leqslant 0.05$ was taken as the limit of significance.

3. Results

(1) *Myocardial catecholamine content*

The effect of severe hypoxia on myocardial catecholamine levels is shown in Figure 1. In control, non-hypoxic perfusions there was a progressive decline in myocardial catecholamine levels. However the rate of this decline was significantly greater in hypoxic hearts.

After pretreatment with reserpine, myocardial noradrenaline level was reduced from 0.56 ± 0.11 μg/g wet weight ($n = 5$) to 0.07 ± 0.02 μg/g wet weight ($n = 5$) (85% reduction) and adrenaline level was reduced from 0.03 ± 0.01 μg/g wet

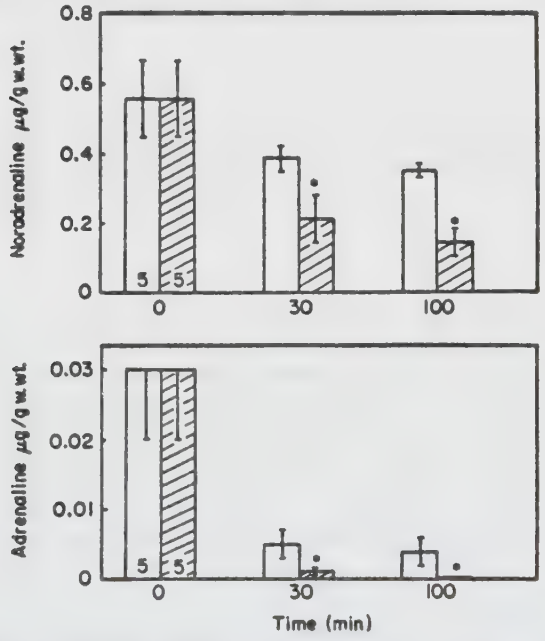


FIGURE 1. Effect of hypoxic perfusions (30 or 100 min) on myocardial levels of noradrenaline and adrenaline in isolated, potassium-arrested rat hearts. Each point represents the mean of five hearts and the bars represent the S.E.M. (*$P \leqslant 0.05$). (□) Control; (▨) hypoxia.

TABLE 1. Effect of 100 min of hypoxia and 20 min of reoxygenation on coronary flow in isolated, K^+ arrested rat hearts

Conditions	Coronary flow (ml/min/g wet wt)									
	Control perfusion (10 min)	Hypoxia (100 min)						Reoxygenation (20 min)		
		1 min	5 min	15 min	30 min	75 min	100 min	2 min	5 min	20 min
(1) Untreated ($n = 8$)	12.7 ± 0.9	20.4 ± 0.9	14.6 ± 0.9	11.8 ± 0.5	10.2 ± 0.5	7.8 ± 0.2	6.7 ± 0.2	5.6 ± 0.3	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.3
(2) Reserpine ($n = 7$)	14.8 ± 1.1	24.0 ± 1.3	18.0 ± 1.1	17.1 ± 1.0	16.5 ± 1.5	15.0 ± 1.7	14.3 ± 1.6	12.7 ± 1.3	12.9 ± 1.3	12.1 ± 1.2
"p"		*	*	*	*	*	*	*	*	*
(3) Reserpine +glucagon ($n = 6$)	16.1 ± 0.9	23.1 ± 0.8	21.4 ± 0.4	20.3 ± 0.5	16.2 ± 1.5	8.8 ± 0.6	7.9 ± 0.4	7.0 ± 0.6	6.3 ± 0.3	6.6 ± 0.5
"p"		*	*			*	*	*	*	*

During the control perfusion, the hearts were perfused for 10 min with Krebs-Henseleit solution containing 11 mM glucose and gassed with 95% O_2 + 5% CO_2. Perfusion was then continued with glucose-free, high potassium Krebs-Henseleit solution gassed with 95% N_2 + 5% CO_2. For details on treatments, see text.

(2) vs (1); (3) vs (2) $^*P \leq 0.05$.

weight ($n = 5$) to barely detectable traces. In all cases, catecholamine levels were analyzed after 10 min of normoxic perfusions of the isolated hearts with standard perfusion fluid containing 11 mM glucose.

(2) *Effect of hypoxia and reoxygenation on coronary flow*

Coronary flow changes occurring during hypoxia and after reoxygenation are shown in Table 1. In untreated hearts, hypoxia first induced a marked increase in coronary flow (which lasted for at least 5 min) followed by a decrease (Table 1). Reoxygenation further decreased coronary flow. Reserpine—pretreated hearts generally exhibited higher initial coronary flows than did untreated hearts. Moreover during hypoxia, after an initial increase, coronary flow never decreased below the pre-hypoxic value. However reoxygenation slightly decreased (15%) the coronary flow (Table 1). In reserpine-treated hearts with glucagon (5 μg), coronary flow remained higher than the pre-hypoxic value up to 60 min of hypoxia. However it decreased thereafter. Reoxygenation did not significantly alter the flow (Table 1).

(3) *Effect of hypoxia and reoxygenation on lactate dehydrogenase (LDH) release*

Figures 2 and 3 show the pattern of LDH release during hypoxia and reoxygenation respectively in all experimental conditions. Untreated hearts exhibited a biphasic LDH release comparable to that described by Hearse *et al.* [*11*]. However LDH release from hypoxic reserpine-pretreated hearts was significantly lower and the biphasic kinetics was never observed (Figure 2). On the other hand, in reserpine-treated hearts, glucagon markedly increased LDH release and restored its biphasic behaviour (Figure 2).

In untreated hearts submitted to reoxygenation after 100 min of hypoxic perfusion, LDH release was greatly increased (Figure 3), an effect previously reported by several authors [*5*, *11*]. However, reserpine pretreatment almost completely prevented the effect of reoxygenation. In the presence of glucagon during hypoxia, the reoxygenation of reserpinized hearts was accompanied by a large increase in LDH release (Figure 3).

Figure 4 shows the effect of hypoxia and reoxygenation on total LDH released during the entire experimental period in all groups (untreated, reserpine-treated, reserpine-treated plus glucagon).

(4) *Effect of hypoxia on metabolite levels and glycolytic activity*

After 100 min of hypoxia, myocardial glycogen fell from 16.7 $\pm$ 2.2 to 1.3 $\pm$ 0.4 μmol glucose equivalent/g wet heart weight. The total lactate output during 100 min of hypoxic perfusion was 283 $\pm$ 18 μmol/g dry heart weight (Table 3) of which 83% were released during the first 50 min. Myocardial ATP and CP levels

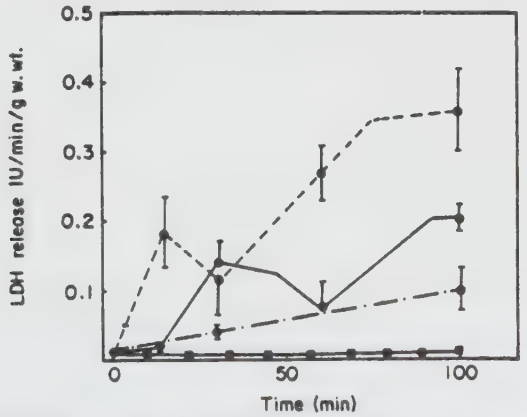


FIGURE 2. Lactate dehydrogenase release profiles (IU/min/g w. wt) from isolated perfused rat hearts following the onset of hypoxia. (●——●) Untreated hearts ($n = 8$); (●— · —●) reserpine-pretreated hearts ($n = 7$); (●- - - -●) reserpine-pretreated hearts plus glucagon ($n = 6$); (■——■) aerobic hearts ($n = 6$).

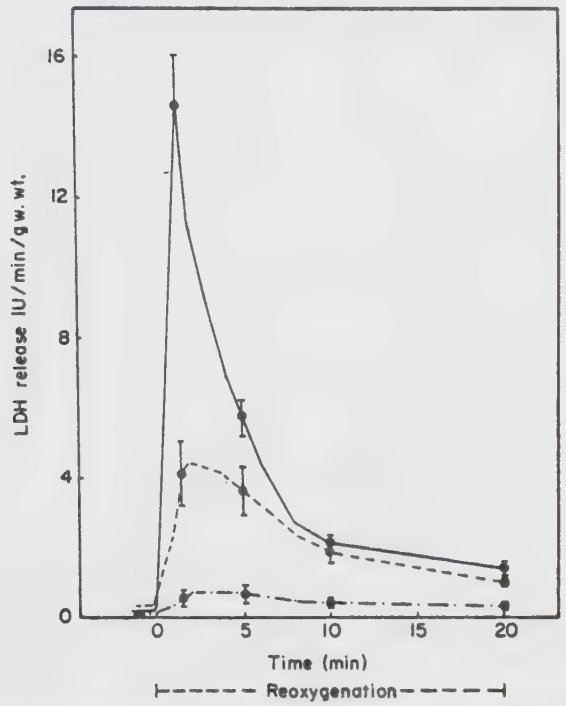


FIGURE 3. Effect of reoxygenation on lactate dehydrogenase release (IU/min/g w.wt) from isolated perfused rat hearts previously submitted to 100 min of hypoxia. (●——●) Untreated hearts ($n = 8$); (●— . —●) reserpine-pretreated hearts ($n = 7$); (●- - - -●) reserpine-pretreated hearts plus glucagon ($n = 6$).

also declined (Table 2, Figure 5). Anaerobic ATP production during hypoxia in the absence of glucose in the perfusate was estimated from the total lactate production assuming that all lactate is derived from endogenous carbohydrate consumption and thus 1 glucose equivalent will yield 3 ATP molecules. According to this estimation glycolytic ATP production was markedly increased during the first 50 min of hypoxia in untreated hearts (Table 3) as estimated by the high production of lactate. However after 50 min of hypoxic perfusion glycolytic ATP production decreased and ATP levels remained low (Table 2, Figure 5).

The initial ATP and CP levels in both reserpine—pretreated and non-treated hearts were not significantly different (Table 2). However initial glycogen level in reserpinized hearts was markedly increased (Table 2).

After 100 min of hypoxia reserpine-pretreated hearts maintained higher levels of glycogen, ATP and CP when compared to both untreated and reserpinized hearts exposed to glucagon (Table 2). Although lactate output in the reserpinized group during the first 50 min of hypoxia was lower than the remaining two groups (Table 2), it increased markedly during the second 50 min of hypoxia. Such a pattern in lactate output was comparable with the decline of ATP in reserpinized hearts.

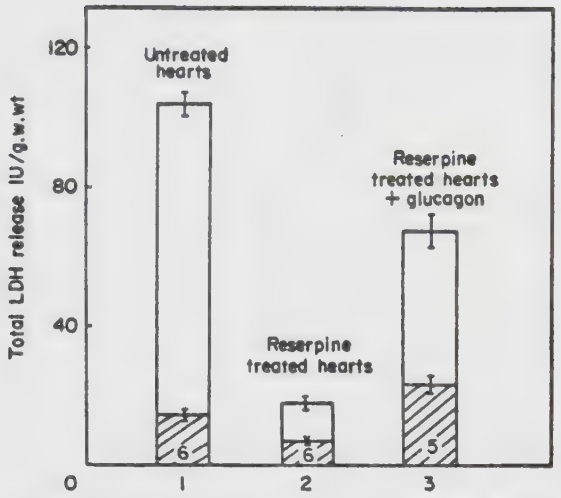


FIGURE 4. Total lactate dehydrogenase release during hypoxia (▩) and following reoxygenation (□) (IU/g w.wt.)
—hypoxia: 2 vs 1 $P \leqslant 0.05$; 3 vs 2 $P \leqslant 0.05$
—reoxygenation: 2 vs 1 $P \leqslant 0.05$; 3 vs 2 $P \leqslant 0.05$
Tests of significance relate to the significance of the difference between untreated and reserpine-pretreated hearts, or between reserpine-pretreated hearts and reserpine-pretreated hearts plus glucagon. Number given at the base of each column = *n*.

(5) *Effect of coronary flow reduction on the release of LDH in reserpinized hearts*

After reserpine pretreament, hypoxia did not induce a diminution in the rate of coronary flow (Table 1) an effect which could at least partly explain the reduced LDH release. We therefore investigated the influence of coronary flow reduction

TABLE 2. Myocardial glycogen, ATP, CP levels in control, normoxic hearts and after 100 min of hypoxic perfusion

Conditions		After 10 min of aerobic perfusion	After 10 min of hypoxic perfusion
Untreated	(1) ATP ($n = 4$) (nmol/mg protein)	31.3 ± 1.2	2.2 ± 0.4
	(2) CP ($n = 4$) (nmol/mg protein)	37.0 ± 0.15	1.5 ± 0.4
	(3) Glycogen ($n = 6$) (μmol glucose equivalents/g. wet wt)	16.7 ± 1.2	1.3 ± 0.4
Reserpine	(4) ATP ($n = 4$)	29.5 ± 0.95	17.5 ± 1.4*
	(5) CP ($n = 4$)	38.6 ± 0.10	9.1 ± 5.3*
	(6) Glycogen ($n = 6$)	44.5 ± 2.2*	5.5 ± 1.9*
Reserpine + glucagon	(7) ATP (= 4)	29.8 ± 0.95	1.15 ± 0.45*
	(8) CP ($n = 4$)	38.6 ± 0.10	0.8 ± 0.7*
	(9) Glycogen ($n = 6$)	44.5 ± 2.2	1.7 ± 0.8*

(4) vs (1); (5) vs (2); (6) vs (3); (7) vs (4); (8) vs (5); (9) vs (6).
*$P \leqslant 0.05$.

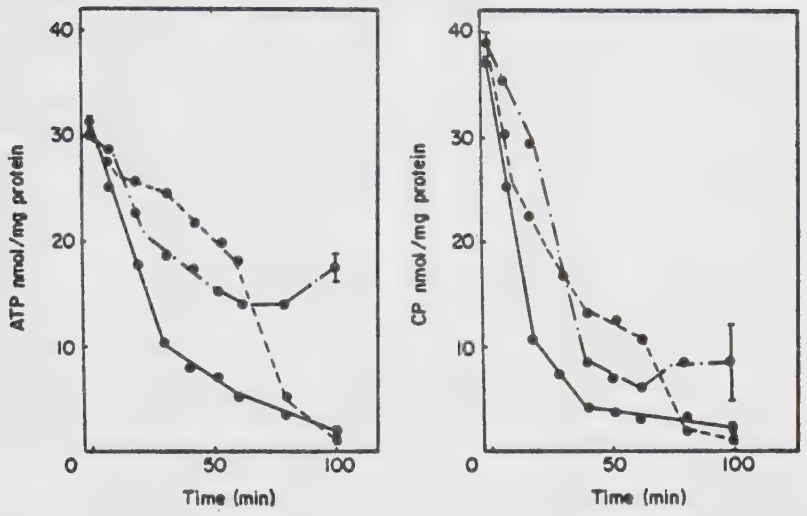


FIGURE 5. Myocardial levels of ATP and CP (nmol/mg protein) at various times following the onset of hypoxia. (●——●) Untreated hearts; (●—·—●) reserpine-pretreated hearts; (●----●) reserpine-pretreated hearts plus glucagon. Each point represents an individual heart except for values at 0 and 100 min (see Table 2).

TABLE 3. Lactate production, total glycolytic ATP production and net rate of ATP utilization under a variety of conditions

	Conditions		Lactate production (μmol/ g dry weight)	Total glycolytic ATP production (μmol ATP/ g dry weight)	New rate of ATP utilization (μmol/min/ g dry weight)
50 min hypoxic perfusion	Untreated ($n = 4$)	(1)	235 ± 15	352 ± 27	7.05 ± 0.55
	Reserpine ($n = 4$)	(2)	139 ± 27*	208 ± 41*	4.1 ± 0.8*
	Reserpine + glucagon ($n = 4$)	(3)	386 ± 11*	571 ± 17*	11.4 ± 0.35*
100 min hypoxic perfusion	Untreated ($n = 8$)	(4)	283 ± 18	424 ± 27	1.45 ± 0.05
	Reserpine ($n = 5$)	(5)	520 ± 89*	779 ± 135*	11.4 ± 0.70*
	Reserpine + glucagon ($n = 5$)	(6)	539 + 48	810 ± 72	4.8 ± 0.35*

(2) vs (1); (3) vs (2); (5) vs (4); (6) vs (5). *$P \leq 0.05$.

TABLE 4. Effect of 100 min of hypoxia and 20 min of reoxygenation on coronary flow and LDH release in isolated, perfused rat hearts

Conditions	Perfusion time sequence									
	Control perfusion (10 min)	Hypoxia (100 min)						Reoxygenation (20 min)		
		1 min	5 min	15 min	30 min	75 min	100 min	2 min	5 min	20 min
Untreated ($n = 8$)										
(1) Coronary flow (ml/min/g w. wt)	12.7 ± 0.9	20.4 ± 0.4	14.6 ± 0.9	11.8 ± 0.5	10.2 ± 0.5	7.8 ± 0.2	6.7 ± 0.2	5.6 ± 0.3	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.3
(2) LDH release (IU/min/g w. wt)	0.02 ± 0.005	—	—	0.02 ± 0.009	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.007	0.20 ± 0.02	11.2 ± 1.0	5.4 ± 0.5	1.4 ± 0.15
Reserpine ($n = 7$)										
(3) Coronary flow	14.8 ± 1.1	24.0 ± 1.3*	18.0 ± 1.0*	17.1 ± 1.0*	16.5 ± 1.5*	15.0 ± 1.7*	14.4 ± 1.6*	12.7 ± 1.3*	12.9 ± 1.3*	12.1 ± 1.3*
(4) LDH release	0.025 ± 0.008	—	—	—	0.04 ± 0.01*	—	0.10 ± 0.03*	0.67 ± 0.29*	0.70 ± 0.26*	0.36 ± 0.13*
Reserpine + ischemia ($n = 6$)										
(5) Coronary flow	14.8 ± 1.4	23.2 ± 1.7	18.4 ± 1.3	13.9 ± 0.8*	12.1 ± 0.9*	7.4 ± 1.1*	6.6 ± 1.1*	7.7 ± 1.8*	7.3 ± 1.7*	6.8 ± 1.7*
(6) LDH release	0.021 ± 0.007	—	—	—	0.03 ± 0.01	—	0.15 ± 0.01	0.69 ± 0.24	0.82 ± 0.28	0.37 ± 0.09

(3) vs (1); (4) vs (2); (5) vs (3); (6) vs (4). *$P \leq 0.05$.

on the release of this enzyme. Thus hypoxic perfusions were performed on reserpinized hearts with flow rates reduced to levels comparable to that observed during hypoxic perfusions in untreated hearts. Table 4 shows that the reduced LDH release during hypoxia in reserpinized hearts was independent on the rate of coronary flow.

4. Discussion

In the present study, we found that myocardial catecholamine stores were progressively decreased during severe hypoxia, an observation which was consistent with results previously reported by Wollenberger and Shahab [*28*] who observed that endogenous noradrenaline content in isolated rabbit heart declined during hypoxia. We have studied the possibility whether myocardial catecholamine released during hypoxic conditions may influence the rate of onset and perhaps the extent of hypoxia-induced myocardial cell damage. Using lactate dehydrogenase release as an index of myocardial cell damage [see ref. *19*], a harmful action of endogenous catecholamine on hypoxic myocardial cells can be inferred to have taken place in the present study. Reserpine pretreatment which lowered endogenous catecholamine stores to about 15% of normal value, markedly reduced lactate dehydrogenase (LDH) release both during hypoxic (50%) and reoxygenation (85%) periods. Although it is possible that such a reduction in LDH release may result from a decrease in cellular LDH activity due to drug treatment, such an hypothesis however was refuted since comparable levels of LDH activity were found both in reserpinized (286 ± 14 IU/g wet wt, $n = 5$) and in untreated hearts (248 ± 13 IU/g wet wt, $n = 5$, N.S.). Reserpine-induced reduction in enzyme release from isolated hearts submitted to various abnormal conditions has already been reported [*18, 22*]. The administration of glucagon, a substance which is known to exhibit catecholamine-like action on the isolated heart [*3*], restored hypoxia-induced myocardial cell damage in reserpinized preparations (i.e. marked reduction in ATP, creatine phosphate (CP) and glycogen contents, and increased LDH release). The reversal of all beneficial effects of reserpine pretreatment in hypoxic hearts by glucagon substantiates the hypothesis that endogenous catecholamines released during the early periods of hypoxia, have deleterious effects on hypoxic myocardial cell. Although we found that a modest release of endogenous catcholamines occurs under well oxygenated conditions (Figure 1), such a release did not seem to exert deleterious effects on the heart. Waldenström *et al.* [*26*] have already suggested that low concentrations of catecholamines in well oxygenated hearts fail to induce myocardial cell damage.

Nothing is known about the underlying cause(s) of the myocardial cell damage which according to the present data may be induced by release of endogenous catecholamines from the isolated and arrested hypoxic heart. The observation of

beneficial effects of catecholamine depletion on the evolution of hypoxic myocardial cells may offer possible clues to the study of the mechanisms of these effects. If so, it seems reasonable to suggest that the increased myocardial glycogen stores observed following catecholamine depletion [Table 2; ref. *6, 23*] might explain reserpine's protective effect against extended periods of oxygen deprivation and reoxygenation. Such a suggestion is based on the fact that glycogen constitutes the sole source of ATP production under hypoxic substrate-free conditions. Thus the maintenance of longer periods of cell viability, as evidenced, either by reduced levels of enzyme release (present study) or improved mechanical resistance to oxygen deprivation in Scheuer and Stezoski's study [*23*] may well result from a continuous glycolytic ATP production through glycogenolysis. It has been already documented that a decrease in myocardial ATP levels below a certain "critical level" is associated with irreversible cell damage [*10*]. In the present study, reserpinized hearts which had higher initial levels of glycogen, most likely preserved "critical levels" of ATP through glycogenolysis and glycolysis even for periods reaching 100 min of severe hypoxia (Table 3). Similar increase in glycogen content in reserpinized hearts has already been reported both in rat [*23*] and in rabbit hearts [*6*]. Although it has been argued [*6*] that reserpine pretreatment may inhibit glycogen breakdown in rabbit hearts during the first 2 min of hypoxia, on the other hand, it has been also demonstrated that reserpine pretreatment in rats does not interfere with glycogen breakdown following longer periods of hypoxia (greater than 2 min) [*1, 23*], as was the case in the present study. Such a discrepancy could be explained by the presence of both species differences (rat-rabbit) and the duration of hypoxia (2 min or greater).

Using isolated mitochondrial preparations, Nayler *et al.* [*20*] have suggested that the preservation of mitochondrial function may be another possible mechanism responsible for the protective effect of reserpine-induced catecholamine depletion on hypoxic myocardial cells. In this study the mitochondrial function was assessed by its ability to accumulate calcium and by its capacity for oxidative phosphorylation.

Finally it is conceivable that the maintenance of adequate coronary flow in reserpinized hearts during hypoxia may at least in part contribute to the preservation of myocardial cells. However, the results of the present study do not attribute to this effect a primary role since experimentally-induced reduction in coronary flow in reserpinized and severely hypoxic hearts did not abolish the beneficial effect of the drug.

The protective effect of catecholamine depletion was particularly apparent in preparations in which reoxygenation was established after hypoxic perfusions (Figure 3). It has been recently emphasized by Hearse *et al.* [*12*] that cytoplasmic calcium overload occurring during hypoxia may be an important triggering factor in the evolution of myocardial cell damage during reoxygenation. Cytoplasmic calcium ions may accumulate within mitochondria in exchange for hydrogen ions

[*17*] immediately following reoxygenation. The consequent sudden acidification of the cytoplasm may exacerbate cell damage [*12*]. In this way, catecholamines (but also other agents that increased cyclic AMP levels in myocardial cells) may contribute to increase cellular calcium during hypoxia, thus increasing cellular damage [*20*]. However, if mitochondrial function remains preserved in catecholamine-depleted hypoxic hearts as suggested by Nayler *et al.* [*20*], massive mitochondrial efflux of protons in exchange for calcium ions will not occur. As a result, cytoplasmic pH will remain within physiological range, and consequently myocardial cell viability will be sustained. Furthermore, the higher stores of glycogen in reserpinized hearts may well provide a steady source of glycolytic ATP which may maintain the ability of the sarcoplasmic reticulum to accumulate calcium ions [*2*], an effect which may further prevent cytoplasmic calcium overload.

In conclusion, the results of the present study suggest that depletion of endogenous catecholamine stores by reserpine is able to exert a beneficial effect on isolated arrested rat hearts, in substrate-free perfusion media, during severe hypoxia and following reoxygenation. Additional studies are needed now, to determine (i) whether such a beneficial effect of catecholamine depletion in hypoxia and reoxygenation represents a true reduction of damage or a delay in its induction, (ii) whether such results can be extrapolated to the clinical situation.

Acknowledgements

We thank Pr Jacques Roffi for helpful cooperation in catecholamine assays and Dr Danielle Feuvray for helpful discussions.

This work is supported in part by a grant from DGRST (76-7-0738).

REFERENCES

1. Cornblath, M., Randle, P. J., Parmeggiani, A. & Morgan, H. E. Regulation of glycogenolysis in muscle. Effects of glucagon and anoxia on lactate production, glycogen content and phosphorylase activity in the isolated perfused rat heart. *Journal of Biological Chemistry* **238**, 1592–1597 (1963).
2. Entman, M. L., Bornet, E. P., Van Winkle, W. B., Goldstein, M. A. & Schwartz, A. Association of glycogenolysis with cardiac sarcoplasmic reticulum. II: Effect of glycogen depletion, deoxycholate solubilization and cardiac ischemia; evidence for a phosphorylase kinase membrane complex. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **9**, 515–528 (1977).
3. Farah, A. & Tuttle, R. Studies on the pharmacology of glucagon. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **129**, 49–55 (1960).
4. Feuvray, D. & de Leiris, J. Ultrastructural modifications induced by reoxygenation in the anoxic isolated rat heart perfused without exogenous substrate. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **7**, 307–314 (1975).
5. Ganote, C. E., Seabra Gomes, R., Nayler, W. G. & Jennings, R. B. Irreversible

myocardial injury in anoxic perfused rat hearts. *American Journal of Pathology* **80**, 419–450 (1975).

6. Gercken, G. & Doring, V. The metabolism of the anoxic heart after surgical denervation or reserpine pretreatment. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **5**, 275–286 (1973).
7. Good, C., Kramer, H. & Somogyi, M. The determination of glycogen. *Journal of Biological Chemistry* **100**, 485 (1933).
8. Gornall, A. G., Bardwill, C. J. & David, M. M. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry* **177**, 751–766 (1949).
9. Gutmann, I. & Wahlefeld, A. W. In *Methoden der Enzymatischen Analyse*, 3rd edit., Vol. II, pp. 1510. H. U. Bergmeyer, Ed. Wienheim: Verlag Chemie (1974).
10. Hearse, D. J. & Chain, E. B. The role of glucose in the survival and recovery of the anoxic isolated perfused rat heart. *Biochemical Journal* **128**, 1125–1133 (1972).
11. Hearse, D. J., Humphrey, S. M. & Chain, E. B. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **5**, 395–407 (1973).
12. Hearse, D. J., Humphrey, S. M. & Bullock, G. R. The oxygen paradox: two facets of the same problem? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **10**, 641–668 (1978).
13. Hearse, D. J., Humphrey, S. M., Feuvray, D. & de Leiris, J. A biochemical and ultrastructural study of the species variation in the myocardial cell damage. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **8**, 759–776 (1976).
14. Lamprecht, W. & Trautschold, I. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd edit., pp. 543–551. H. U. Bergmeyer, Ed. Wienheim: Verlag Chemie (1965).
15. Lamprecht, W. & Stein, P. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd edit., pp. 610–616. H. U. Bergmeyer, Ed. Wienheim: Verlag Chemie (1965).
16. Langendorff, O. Untersuchungen am über lebender Säugertierherzen. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **61**, 291–332 (1895).
17. Lehninger, A. L. Mitochondria and calcium ion transport. *Biochemical Journal* **119**, 129–138 (1970).
18. de Leiris, J., Feuvray, D. & Come, C. Acetylcholine-induced release of lactate dehydrogenase from isolated rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **4**, 357–365 (1972).
19. de Leiris, J., Feuvray, D., Hermens, W. T. & Loisance, D. Myocardial ischaemia and enzyme release. *Journal of Molecular Medicine* **2**, 183–349 (1977).
20. Nayler, W. G., Fassold, E. & Yepes, C. Pharmacological protection of mitochondrial function in hypoxic heart muscle. Effect of verapamil, propranolol and methylprednisolone. *Cardiovascular Research* **12**, 152–161 (1978).
21. Neely, J. R., Liebermeister, H., Battersby, E. J. & Morgan, H. E. Effect of pressure development on oxygen consumption by the isolated rat heart. *American Journal of Physiology* **216**, 804–814 (1967).
22. Sakai, K. & Spieckerman, P. G. Effects of reserpine and propranolol on anoxia induced enzyme release from the isolated perfused guinea pig heart. *Naunyn- Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie u. Pharmakologie* **291**, 123–130 (1975).
23. Scheuer, J. & Stezoski, W. Protective role of increased myocardial glycogen stores in cardiac anoxia in the rat. *Circulation Research* **27**, 835–849 (1970).
24. Sobel, B. E., Shell, W. E. & Klein, M. S. An isoenzyme of creatine phosphokinase associated with rabbit heart mitochondria. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **4**, 367–380 (1972).
25. Von Euler, U. S. & Lishajko, F. Improved technique for the fluorimetric estimation of catecholamines. *Acta physiologica scandinavica* **51**, 348–356 (1961).

26. Waldenström, A. P., Hjalmarson, A. C. & Thornell, L. A possible role of noradrenaline in the development of myocardial infarction. *American Heart Journal* **95**, 43–51 (1978).
27. Wollenberger, A., Ristau, O. & Schoffa, G. Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung grösserer Gewebestücke. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **270**, 399–412 (1960).
28. Wollenberger, A. & Shahab, L. Anoxia induced release of noradrenaline from the isolated perfused heart. *Nature* **207**, 88–89 (1965).
29. Wroblewski, F. & La Due, J. S. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **90**, 210–213 (1955).

Masson, Paris, 1980

J. Physiol., Paris, 1980, 76, 813-819
Symposium Myocardial ischemia and reperfusion,
Grenoble, September 17th, 1979

Lésions cellulaires précoces induites par l'hypoxie myocardique : rôle éventuel de l'AMP cyclique*

Joël de LEIRIS, Jean-Marc BÉGUÉ, Yann GAUDUEL et Danielle FEUVRAY

*Laboratoire de Physiologie animale, Université Scientifique et Médicale, B.P. 53X, F-38041 Grenoble**.*
Laboratoire de Physiologie comparée, Université de Paris-Sud, F-91405 Orsay.

SUMMARY : **Early cellular alterations induced by myocardial hypoxia : possible role of cyclic AMP.**

The ability of endogenous myocardial catecholamines to participe in the development of myocardial cellular alterations during a short period of severe hypoxia (30 min) was studied in isolated, Langendorff-perfused rat heart preparation, arrested by a high potassium concentration (16 mM) and perfused in the absence of exogenous substrate (Table I). Tyramine, which accelerated catecholamine depletion, also increased myocardial cell damage as assessed by a higher lactate dehydrogenase (LDH) release and a more marked reduction in cellular levels of high energy phosphates and glycogen (Table II). On the other hand, under conditions of β -blockade (atenolol), hypoxia-induced tissular damage was reduced (Table II). These changes could be related to modifications in the cellular content of cyclic AMP (cAMP) since cAMP was consistently higher during the first 30 min of hypoxic perfusion than in control normoxic hearts (Table III) whereas cyclic GMP content remained unchanged. Moreover, interventions increasing cellular content of cAMP (theophylline, dibutyryl-cAMP) also increased hypoxic damage (Table IV), whereas N-methyl imidazole which reduced cellular content of cAMP lessened hypoxia-induced cellular alterations (Table IV).

It is concluded that cellular lesions developing during the first 30 min of hypoxia in isolated arrested rat heart preparation perfused without exogenous substrate could be related to intracellular accumulation of cAMP occurring under the effect of endogenous catecholamine release.

Key-words : Hypoxia. Isolated perfused rat heart. Enzyme release. Cellular alterations. Cyclic nucleotides. ATP. Creatine phosphate.

RÉSUMÉ :

Le présent travail a pour but de mettre en évidence le rôle éventuel des catécholamines endogènes dans la phase initiale du dommage cellulaire induit par l'hypoxie au niveau du cœur isolé de Rat, perfusé en l'absence de substrat métabolique, et arrêté par une concentration élevée de potassium. Sur ces préparations, l'accélération de la déplétion des catécholamines endogènes par la tyramine accroît le degré des altérations cellulaires objectivées par la quantité d'enzymes libérée au cours des 30 premières minutes d'hypoxie ou par le taux cellulaire d'ATP, de créatine phosphate et de glycogène. Par ailleurs, ces altérations apparaissent réduites après blocage des récepteurs β-adrénergiques cardiaques par l'aténolol.

Il est probable que cet effet des catécholamines endogènes dépend de l'augmentation du taux tissulaire d'AMP cyclique, puisque ce nucléotide augmente au cours des 30 premières minutes d'hypoxie, et que par ailleurs, les interventions qui augmentent (théophylline, dibutyryl AMPc), ou diminuent (N-méthyl imidazole) sa concentration cellulaire, accroissent ou réduisent le dommage cellulaire hypoxique.

Il est donc proposé que les lésions précoces indûites par l'hypoxie au niveau du cœur isolé de rat, perfusé en l'absence de substrat métabolique, pourraient dépendre en partie de l'accumulation tissulaire d'AMPc favorisée par la libération des catécholamines endogènes cardiaques au cours de la privation d'oxygène.

Mots-clés : Hypoxie. Cœur isolé perfusé de Rat. Libération d'enzymes. Lésions cellulaires. Nucléotides cycliques. ATP. Créatine phosphate.

INTRODUCTION

Il est bien établi que l'hypoxie de longue durée provoque au niveau du cœur isolé de rat le développement d'altérations cellulaires accompagnées :

1° d'un effondrement rapide des réserves énergétiques ou métaboliques cellulaires (adénosine triphosphate ATP, créatine phosphate CP, glycogène) (OPIE, 1969) ;

2° d'une fuite transmembranaire de macromolécules (enzymes cytosoliques ou mitochondriales) présentant une cinétique biphasique : la première phase ayant un maximum aux environs de la 20e minute d'hypoxie, la seconde phase démarrant vers la 60e minute et pré-

* Reçu en première lecture le 18 février 1980, en dernière lecture le 19 mai 1980.
** Travail effectué avec l'aide d'un contrat INSERM (ATP 63-78-95-007).

sentant une amplitude beaucoup plus marquée que la première (HEARSE *et al.*, 1976) ;

3° d'altérations morphologiques (FEUVRAY et DE LEIRIS, 1975).

Par ailleurs, le degré de ces altérations peut être considérablement accru si l'on augmente la durée de la perfusion hypoxique, ou si l'on réadmet brutalement l'oxygène dans le liquide de perfusion (FEUVRAY et DE LEIRIS, 1975 ; HEARSE *et al.*, 1976).

Nous avons récemment démontré que les catécholamines endogènes jouaient un rôle majeur dans le développement de ces processus de lésions cellulaires (GAUDUEL *et al.*, 1979). En effet, l'hypoxie et la réoxygénation apparaissent beaucoup moins toxiques lorsque ces agressions sont réalisées au niveau de cœurs isolés d'animaux ayant été prétraités par la réserpine, et qui présentent de ce fait une déplétion de leur stock tissulaire de catécholamines : le premier pic de libération de constituants cellulaires macromoléculaires est alors complètement aboli, tandis que le second pic est notablement réduit ; par ailleurs, la réoxygénation n'exerce aucun effet aggravant notable. Un tel effet protecteur a été interprété en termes d'énergétique cellulaire dans la mesure où le contenu tissulaire en ATP, en CP et en glycogène apparaît relativement bien maintenu après 100 min d'hypoxie au niveau des cœurs réserpinés (GAUDUEL *et al.*, 1979).

Le but du présent travail est de tester l'hypothèse selon laquelle la première phase de développement de lésion cellulaire au cours de l'hypoxie cardiaque (objectivée par le premier pic de libération d'enzymes) pourrait être directement dépendante de la libération des catécholamines endogènes, tandis que la deuxième phase (second pic de libération d'enzymes) résulterait d'une détérioration progressive des structures cellulaires induite par l'épuisement des réserves énergétiques tissulaires. Cette hypothèse est en particulier fondée sur des résultats antérieurs concernant la cinétique de libération des catécholamines endogènes (GAUDUEL *et al.*, 1979), qui semble essentiellement intervenir au cours des 30 premières minutes d'hypoxie. Nous avons donc cherché à préciser si l'accélération de cette libération par la tyramine ou le blocage des récepteurs β-adrénergiques par l'aténolol pouvaient modifier l'évolution du dommage cellulaire hypoxique. Par ailleurs, nous avons recherché si l'AMP cyclique (AMPc) pouvait jouer un rôle dans le développement de la lésion tissulaire, en mesurant le contenu cellulaire de ce nucléotide, en utilisant différents composés modifiant ses vitesses de synthèse ou de dégradation, en administrant enfin une forme pénétrante de ce composé, le dibutyryl AMPc.

TECHNIQUES

Nous avons utilisé 150 rats mâles de la souche Wistar, pesant 310 ± 25 g, nourris selon le régime standard du laboratoire.

1) Technique de perfusion.

Les rats sont anesthésiés à l'éther, puis reçoivent 100 unités internationales d'héparine dans la veine fémorale. Le cœur est ensuite excisé rapidement selon la technique de NEELY *et al.* (1967), plongé dans du liquide de perfusion refroidi, monté par l'aorte sur une canule de perfusion en acier, et perfusé par voie rétrograde selon la technique de LANGENDORFF (1895) sous 10 kPa de pression hydrostatique et à 37 °C. L'artère pulmonaire est incisée pour faciliter le drainage du système coronaire.

2) Milieu de perfusion.

Le milieu de perfusion est un tampon bicarbonate de type KREBS-HENSELEIT (1932). Durant la période d'hypoxie, l'activité contractile cardiaque est stoppée par augmentation de la concentration en potassium du milieu de perfusion de 5,6 mM à 16 mM, la teneur en sodium étant diminuée de façon correspondante pour respecter l'équilibre osmotique. Une telle augmentation de la concentration extracellulaire en potassium permet de prévenir le développement aléatoire de troubles du rythme dans la période initiale d'hypoxie, et d'obtenir ainsi des conditions expérimentales plus reproductibles (HEARSE *et al.*, 1976).

Avant la perfusion, les solutions utilisées sont filtrées sur filtre d'acétate de cellulose dont les pores ont un diamètre de 0,8 µm.

Le liquide de perfusion, maintenu à 37 °C ± 0,5 °C, est saturé d'un mélange O_2 : CO_2 (95 : 5) pendant les perfusions normoxiques (pression partielle en oxygène à l'entrée du cœur : 580 mmHg ; pH 7,4) ou d'un mélange N_2 : CO_2 (95 : 5) au cours des phases d'hypoxie (pression partielle en oxygène : 5 à 10 mmHg ; pH 7,4). Par ailleurs, le cœur est placé dans une chambre de verre thermostatée à 37 °C, et dans laquelle circule le mélange gazeux utilisé pour saturer le liquide de perfusion.

3) Decours de la perfusion.

Dès l'installation du cœur sur l'appareil de perfusion, la préparation est perfusée pendant 10 min avec un liquide de perfusion standard oxygéné contenant 11 mM de glucose, mais dépourvu d'insuline. A l'issue de cette période de stabilisation, les préparations, arrêtées par une concentration élevée de potassium (16 mM), sont perfusées pendant 30 à 100 min en hypoxie en l'absence de substrat métabolique (glucose = 0).

Durant la perfusion, le débit coronaire est mesuré à l'éprouvette toutes les 5 min, et à la fin de chaque expérience, le poids de la masse ventriculaire est déterminé.

4) Dosages.

Sur des échantillons de l'effluent coronaire prélevés à des instants déterminés, on mesure l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) selon la méthode spectrophotométrique de WROBLEWSKI et LA DUE (1955) et la concentration en lactate par la méthode de GUTMAN et WAHLEFELD (1974) en utilisant un photomètre 6120 Eppendorff. L'activité LDH est exprimée en mUI libérées par minute, ou par ml d'effluent coronaire, ou par gramme de poids frais de cœur ; la concentration en lactate est exprimée en micromoles par gramme de poids frais.

Dans les expériences où l'on cherche à suivre l'état énergétique des préparations, celles-ci sont congelées rapidement à l'aide de la pince décrite par WOLLENBERGER *et al.* (1960) refroidie à la température de l'azote liquide. Le tissu congelé est broyé sous azote liquide et deprotéinisé par une solution d'acide perchlorique (0,66 N, 7 ml par gramme de tissu). Après centrifugation, l'ATP et la CP sont dosées dans le surnageant, après neutralisation de celui-ci par de la potasse, par des techniques enzymatiques classiques de LAMPRECHT

et TRAUTSCHOLD (1965) et LAMPRECHT et STEIN (1965). Les résultats sont exprimés en nmoles/mg protéines pour tenir compte des variations possibles de la teneur en eau du tissu au cours de la perfusion (OPIE, 1965). Le contenu tissulaire en protéines est estimé dans le culot de centrifugation par la méthode du biuret (GORNALL *et al.*, 1949). Le glycogène tissulaire est dosé selon la méthode de GOOD *et al.* (1933), et exprimé en µmoles d'équivalents glucose/mg de protéines.

L'AMPc et le GMPc tissulaires sont dosés par la méthode de STEINER *et al.* (1972).

5) TRAITEMENTS UTILISES.

A) *Rôle des catécholamines endogènes.*

WEINER *et al.* (1962) ont montré que la tyramine exerce un effet sympathomimétique en provoquant la libération de la noradrénaline endogène du cœur de Chat. AXELROD *et al.* (1962) indiquent que la tyramine, entraîne la libération de 45 % du stock tissulaire de noradrénaline dans le cœur isolé et perfusé de Rat. Pour vérifier un effet aggravant éventuel de l'accélération de la libération des catécholamines au cours de la phase initiale d'hypoxie, nous avons utilisé une solution de tyramine (chlorhydrate de tyramine à 2 mg/ml de solution physiologique) injectée par fractions de 200 µl toutes les 10 min au cours de la perfusion hypoxique.

De la même manière, nous avons provoqué le blocage des récepteurs β-adrénergiques en injectant aux rats 2 mg/kg de poids corporel d'aténolol (ICI 66 082) par voie intraveineuse, 10 min avant le prélèvement cardiaque. De plus, dans cette série expérimentale, toute la perfusion (normoxique et hypoxique) est réalisée en présence de ce composé à la concentration finale de 10^{-4} M. L'aténolol présente l'avantage d'être un composé β-adrénolytique cardiospécifique, dépourvu de propriétés sympathomimétiques intrinsèques ou de type stabilisant de membrane.

B) *Rôle de l'AMPc.*

Pour inhiber l'activité phosphodiestérasique et tenter d'augmenter ainsi le contenu cellulaire en AMPc, nous avons ajouté dans certaines expériences, à la solution de perfusion hypoxique, de la théophylline à la concentration finale de 2.10^{-2} M (APPLEMAN et TERASAKI, 1975). A l'inverse, l'accélération de la dégradation de l'AMPc sous l'effet du N-méthyl imidazole (KUKOVETZ et POCH, 1969) nous a conduits à utiliser cette substance dans la solution de perfusion hypoxique à la concentration finale de 10^{-2} M.

Enfin, nous avons utilisé une forme pénétrante d'AMPc, le dibutyryl-AMPc à la concentration finale de 10^{-4} M (POSTERNAK *et al.*, 1962).

6) ANALYSE STATISTIQUE.

Les résultats sont présentés comme la moyenne de n expériences ± l'erreur standard à la moyenne. Dans les cas de comparaison de moyennes de 2 échantillons de valeurs, le test « t » de STUDENT a été utilisé, avec $P < 0.05$ comme limite de signification.

RÉSULTATS

1) PRÉPARATIONS NON TRAITÉES.

Au cours d'une perfusion hypoxique de 5 à 100 min en absence de glucose, le cœur arrêté au potassium présente (Tabl. I).

1° une libération biphasique de lactate déshydrogénase. Comme cela a déjà été rapporté (HEARSE *et al.*, 1976 ; GAUDUEL *et al.*, 1979) le maximum de la première phase est observé après une période de 20 min d'hypoxie, et cette phase qui s'étale sur les 50 premières minutes d'hypoxie est suivie d'une deuxième phase plus ample ;

2° une diminution considérable des contenus tissulaires en ATP, CP et glycogène ;

3° une production de lactate, surtout importante au cours des 30 premières minutes d'hypoxie.

Parallèlement à ces effets métaboliques, on note une évolution du débit coronaire qui, après une brève phase d'augmentation initiale, diminue ensuite tout au long de la perfusion hypoxique, comme nous l'avons déjà rapporté précédemment (GAUDUEL *et al.*, 1979).

2) EFFETS DE LA TYRAMINE ET DE L'ATÉNOLOL.

Pour tester l'hypothèse formulée plus haut, nous avons suivi les valeurs de libération de LDH, respectivement au cours du premier pic (0 à 50 min d'hypoxie) et du second pic de libération d'enzymes (50 à 100 min d'hypoxie). De la même manière, nous avons choisi

TABLEAU I. — *Effet de différentes durées de perfusion hypoxique en l'absence de substrat métabolique sur la libération de LDH et de lactate, et sur le contenu cellulaire en ATP, PC et glycogène du cœur isolé de Rat, arrêté par une solution de perfusion enrichie en KCl (16 mM).*
Les chiffres du tableau correspondent à la moyenne d'échantillons de 10 mesures différentes (moyenne ± SEM).
• Au cours des 10 min de pré-perfusion normoxique.

TABLE I. — *Effect of various durations of hypoxic perfusion (glucose = 0) on lactate dehydrogenase (LDH) release and cellular levels of ATP, creatine phosphate and glycogen in isolated rat hearts.*
Values are means ± SEM.
• During the 10 min wash-out and « equilibration » normoxic perfusion with glucose (11 mM).

Durée de la perfusion hypoxique en minutes	Libération de LDH mUI/min/g poids frais	ATP nmoles/mg protéines	CP nmoles/mg protéines	Glycogène µmoles glucose équivalent/mg protéines	Production de lactate µmoles/g poids frais en 30 ou 100 min
0	30,9 ± 1,7	31,0 ± 2,2	36,3 ± 1,4	0,15 ± 0,02	29 ± 4•
5	34,5 ± 6,7	22,0 ± 2,0	25,0 ± 1,0	—	—
15	103 ± 20	—	—	—	—
20	168 ± 20	16,4 ± 0,2	10,6 ± 1,1	—	—
30	137 ± 11	9,2 ± 0,2	4,45 ± 0,10	0,059 ± 0,003	214 ± 8
60	68 ± 13	—	—	—	—
100	201 ± 20	0,68 ± 0,13	1,2 ± 0,2	0,010 ± 0,001	290 ± 20

TABLEAU II. — *Effets du traitement par la tyramine ou par l'aténolol sur la libération de LDH et le contenu tissulaire en ATP et CP au cours d'une perfusion hypoxique (sans substrat métabolique) du cœur isolé de rat arrêté par un excès de potassium (KCl = 16 mM).*
Les concentrations en ATP et CP ont été mesurées soit après 20 min de perfusion hypoxique (c'est-à-dire aux environs du maximum de la première phase de LDH), soit à la fin d'une période de 100 min d'hypoxie. Pour le détail sur le traitement, voir le paragraphe Techniques. Les résultats sont donnés comme la moyenne de 9 à 10 mesures individuelles (moyenne ± SEM). * Significativement différent $P < 0,05$ (2 *vs* 1 et 3 *vs* 1).

TABLE II. — *Effect of tyramine and atenolol on LDH release and cellular levels of ATP, CP, and glycogen at the end of a 30 min hypoxic and substrate-free perfusion in isolated arrested rat hearts.*
ATP and CP levels are given either after 20 min of hypoxic perfusion (*i.e.*, at the maximum of phase 1 of the enzyme release, see HEARSE *et al.*, 1978), or after 100 min of oxygen deprivation (*i.e.*, during the second phase of enzyme release, see also HEARSE *et al.*, 1978). Values are means ± SEM ; n = number of experiments. * Significantly different $p < 0.05$ (2 *vs* 1, and 3 *vs* 1).

Conditions	Libération de LDH UI/g poids frais		ATP nmoles/mg protéines à 20 min	CP nmoles/mg protéines à 20 min	ATP nmoles/mg protéines à 100 min	Cp nmoles/mg protéines à 100 min
	1er pic 0 à 50 min	Libération globale 0 à 100 min				
1. Cœurs hypoxiques non traités (n = 9).	6,1 ± 0,1	14,3 ± 1,2	16,4 ± 0,2	10,6 ± 1,1	0,68 ± 0,13	1,2 ± 0,2
2. Cœurs hypoxiques + tyramine (n = 10).	10,7 ± 1,5*	23,5 ± 3,0*	7,7 ± 0,7*	6,9 ± 0,9*	0,25 ± 0,15 NS	0,6 ± 0,5 NS
3. Cœurs hypoxiques + aténolol (n = 9).	3,0 ± 0,2*	12,9 ± 1,2 NS	20,3 ± 1,4*	21,2 ± 1,1*	0,9 ± 0,3 NS	1,05 ± 0,85 NS

de mesurer les contenus tissulaires en ATP et CP au sommet du premier pic de libération (20 min d'hypoxie) et à la fin de la perfusion hypoxique.

Le Tableau II montre que le traitement par la tyramine augmente l'importance du premier pic de libération de LDH (0 à 50 min d'hypoxie), tandis que les contenus en ATP et en CP au sommet de ce premier pic (20 min d'hypoxie) sont significativement inférieurs à ceux des cœurs hypoxiques non traités. Un effet inverse est obtenu sous traitement par l'aténolol.

Pour les hypoxies de 100 min, si l'effet aggravant de la tyramine reste significatif en ce qui concerne la libération d'enzymes, et net, bien que non significatif, en ce qui concerne l'état énergétique de la préparation, l'effet bénéfique de l'aténolol n'est pas retrouvé.

Il semble donc qu'au cours de la phase initiale d'hypoxie, les composés qui accélèrent la libération des catécholamines endogènes augmentent l'importance de la lésion cellulaire hypoxique, tandis que le blocage des récepteurs β-adrénergiques exerce un effet protecteur.

3) MODIFICATIONS DU CONTENU CELLULAIRE EN NUCLÉOTIDES CYCLIQUES AU COURS DE L'HYPOXIE.

Le Tableau III indique que dès le début des conditions hypoxiques, on assiste à une augmentation nette du contenu tissulaire en AMPc. Après 30 min d'hypoxie, la concentration en AMPc est encore significativement plus élevée que dans la phase préhypoxique, tandis qu'à la fin des 100 min de perfusion hypoxique, le tissu cardiaque présente un contenu en AMPc dont la valeur très faible reflète probablement la fuite transmembranaire de ce composé.

En ce qui concerne le GMPc, sa concentration reste remarquablement stable au cours des 30 premières

TABLEAU III. — *Effet de différentes durées de perfusion hypoxique sur le contenu tissulaire en AMP cyclique et GMP cyclique du cœur isolé de rat.*
* Significativement différent des valeurs préhypoxiques ($P < 0,05$).
TABLE III. — *Effect of hypoxia on cellular levels of cyclic AMP (cAMP) and of cyclic GMP (cGMP) in isolated, arrested rat hearts.*
* $p < 0.05$ *vs* prehypoxic values.

Durée de la perfusion hypoxique en minutes	AMP cyclique picomoles/mg protéines	GMP cyclique picomoles/mg protéines
0 n = 5	2,64 ± 0,20	0,27 ± 0,02
1 n = 5	10,2 ± 0,5*	0,32 ± 0,08 NS
3 n = 5	6,4 ± 0,4*	0,28 ± 0,03 NS
5 n = 5	5,08 ± 0,01*	0,35 ± 0,08 NS
6 n = 1	4,27	0,25
30 n = 5	4,05 ± 0,22*	0,17 ± 0,01*
100 n = 5	0,47 ± 0,01*	0,054 ± 0,03*

TABLEAU IV. — *Effet de divers traitements sur le contenu tissulaire en AMP cyclique, ATP, CP et glycogène, et la libération de LDH du cœur isolé de rat perfusé pendant 30 min en conditions hypoxiques et sans substrat métabolique.*
* Significativement différent de la valeur des cœurs non traités ($P < 0,05$; 3 *vs* 2, 4 *vs* 2, 5 *vs* 2). Moyenne ± SEM.

TABLE IV. — *Effect of various treatments (for details, see text) on cellular levels of cAMP, ATP, CP and glycogen, and LDH release from isolated rat hearts, arrested by high potassium, perfused without exogenous substrate, and submitted to 30 min hypoxic conditions.*
Values are means ± SEM. * $p < 0.05$ *vs* untreated hearts (3 *vs* 2, 4 *vs* 2, 5 *vs* 2).

Conditions	AMPc picomoles/mg protéines	ATP nanomoles/mg protéines	CP nanomoles/mg protéines	Glycogène moles glucose équivalents/mg protéines	Libération de LDH UI/30 min g poids frais
1. Cœurs contrôles (n = 10).	2,64 ± 0,22	31,0 ± 2,2	36,3 ± 1,4	0,15 ± 0,02	—
2. Cœurs hypoxiques non traités (n = 10).	4,05 ± 0,22	9,2 ± 0,2	4,45 ± 0,10	0,059 ± 0,003	2,79 ± 0,03
3. Cœurs hypoxiques + théophylline (n = 6).	14,3 ± 0,4*	1,3 ± 0,1*	2,0 ± 0,2*	0,040 ± 0,005 NS	3,27 ± 0,17*
4. Cœurs hypoxiques + N-méthyl imidazole (n = 6).	2,70 ± 0,06*	3,3 ± 0,3*	1,2 ± 0,1*	0,143 ± 0,006*	1,37 ± 0,03*
5. Cœurs hypoxiques + dibutyryl AMPc (n = 6).	49,0 ± 1,0*	1,1 ± 0,2*	0,37 ± 0,07*	0,018 ± 0,001*	4,55 ± 0,20*

minutes d'hypoxie, mais devient très faible à la fin de la phase de 100 min de perfusion hypoxique, ceci étant probablement dû, comme pour l'AMPc, à une fuite vers le compartiment extracellulaire.

4) EFFET DES COMPOSÉS MODIFIANT LA TENEUR CELLULAIRE EN AMPc.

Le Tableau IV illustre l'effet de la théophylline (2.10^{-2} M), du N-méthyl imidazole (10^{-2} M) et du dibutyryl AMPc (10^{-4} M), après 30 min de perfusion hypoxique, sur les contenus cellulaires en AMPc, ATP, CP, glycogène et sur la libération de LDH.

La théophylline augmente le contenu tissulaire en AMPc et la libération de LDH, mais réduit les taux d'ATP, de CP et de glycogène.

L'imidazole entraîne une réduction de l'accumulation d'AMPc, et semble exercer un effet protecteur qui se traduit par une réduction de la libération de LDH et un meilleur maintien des taux d'ATP et de glycogène. Le dibutyryl AMPc pénètre dans la cellule, et entraîne l'augmentation marquée de la concentration tissulaire de ce nucléotide cyclique ; cet effet est accompagné d'une aggravation de la lésion tissulaire, objectivée par la libération de LDH et l'effondrement des réserves énergétiques et métaboliques.

DISCUSSION

Dans le présent travail, nous apportons une confirmation à l'hypothèse que nous avions formulée précédemment (GAUDUEL *et al.*, 1979), selon laquelle les lésions cellulaires cardiaques se développant au cours de perfusions hypoxiques de longue durée en l'absence de substrat métabolique dépendraient en partie des catécholamines endogènes. Nous avons systématiquement considéré que l'importance de la lésion cellulaire pouvait être objectivée par la quantité de lactate déshydrogénase libérée dans l'effluent coronaire (DE LEIRIS *et al.*, 1977 : HEARSE et DE LEIRIS, 1979).

On sait en effet, depuis les travaux de WOLLENBERGER et SHAHAB (1965), que l'hypoxie provoque une libération de catécholamines tissulaires cardiaques. Par ailleurs, la déplétion préalable de ces médiateurs par un traitement par la réserpine accroît notablement les capacités de résistance du tissu cardiaque à la privation d'oxygène (GAUDUEL *et al.*, 1979 ; FEUVRAY *et al.*, 1980). Toutefois, il semble que cet effet protecteur, dont l'explication tient probablement à l'amélioration des capacités du tissu cardiaque à fabriquer de l'énergie par voie anaérobie (réserve glycogénique augmentée), consiste plutôt en un retard du développement des lésions cellulaires qu'en une protection durable (GAUDUEL *et al.*, 1979 ; FEUVRAY *et al.*, 1980).

Le présent travail permet de proposer une explication à l'allure biphasique de la libération d'enzymes intervenant au cours de l'hypoxie de longue durée. En effet, la libération de catécholamines se produit essentiellement au cours des 30 premières minutes d'hypoxie (GAUDUEL *et al.*, 1979) et est ainsi contemporaine du premier pic de libération d'enzymes. On peut donc supposer que ce premier pic reflète le développement de lésions des cellules hypoxiques sous l'effet des catécholamines. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'injection de la tyramine, qui accélère la libération des catécholamines endogènes, se solde par une aggravation marquée du dommage cellulaire, objectivée par l'augmentation du premier pic de libération de lactate déshydrogénase ou par la réduction considérable du contenu cellulaire en composés riches en énergie

Par ailleurs, si durant cette même période les récepteurs β-adrénergiques sont bloqués par l'aténolol, la lésion cellulaire est réduite. Dans cette perspective, la deuxième phase de libération d'enzymes pourrait traduire le développement d'altérations irréversibles liées probablement à l'effondrement des réserves énergétiques tissulaires. Ainsi, plus cet effondrement serait précoce (par exemple après action de la tyramine), plus le second pic de libération serait d'amplitude élevée.

Par ailleurs, l'augmentation rapide du contenu cellulaire en AMPc, qui reste encore supérieur à la valeur préhypoxique après 30 min de privation d'oxygène, est en accord avec les données précédentes. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux de WOLLENBERGER *et al.* (1969) qui indiquent que la pose d'une ligature coronaire double le contenu cardiaque en AMPc en quelques secondes, et que cette élévation se maintient pendant au moins 15 min après la ligature, tandis que le blocage des récepteurs adrénergiques empêche cette augmentation.

La synthèse de l'AMPc dépend du système adénylcyclasique dont l'activation par les catécholamines pourrait contribuer dans nos conditions expérimentales à la dégradation des stocks énergétiques tissulaires, l'ATP étant nécessaire à la synthèse de l'AMPc, et ce dernier activant les protéines kinases impliquées dans le catabolisme cellulaire.

Il a été proposé que les concentrations relatives d'AMPc et de GMPc pourraient influencer la réponse du myocarde à divers stimulus pathologiques comme l'ischémie ou l'hypoxie (BUSUTTIL *et al.*, 1976). Nos résultats, cependant, démontrent que l'augmentation du contenu tissulaire en AMPc au cours de la période initiale d'hypoxie n'est accompagnée d'aucun changement significatif du GMPc.

Nos résultats indiquent en outre que sous l'effet de la théophylline, qui augmente le contenu tissulaire en AMPc, la libération de LDH au cours des 30 premières minutes d'hypoxie est augmentée. Cet effet est accompagné d'une réduction plus marquée des contenus en ATP et en CP. La théophylline est l'inhibiteur des phosphodiestérases le plus utilisé (APPLEMAN et TERASAKI, 1975). Il faut par ailleurs noter que ce composé stimule directement le canal calcique en entraînant une libération de calcium et une diminution du recaptage de cet ion (WEBER et HERZ, 1968).

L'effet aggravant de la théophylline pourrait donc s'expliquer soit sur la base d'une réduction du stock énergétique tissulaire, soit, comme cela a déjà été proposé (NAYLER *et al.*, 1978 ; HEARSE *et al.*, 1978 ; GAUDUEL *et al.*, 1979), en terme de dysfonctionnement de la régulation des pools calciques cellulaires.

L'activation de la phosphodiestérase par l'imidazole a été démontrée en 1962 par BUTCHER et SUTHERLAND, et confirmée en 1969 par KUKOVETZ et POCH. La forme N-méthylée de l'imidazole est encore plus efficace (KUKOVETZ et POCH, 1969). Dans nos expériences, l'addition de ce composé au liquide de perfusion entraîne une diminution du contenu cellulaire en AMPc et une réduction de la libération de LDH après 30 min d'hypoxie. Toutefois, cet effet est accompagné d'une diminution marquée de l'ATP et de la CP. En revanche, la concentration en glycogène reste plus élevée qu'au niveau des préparations non traitées. Il est probable que l'activation de la dégradation de l'AMPc entraîne une accélération de la synthèse de ce nucléotide (KRUSE et SCHOLZ, 1978), ce qui contribuerait à une diminution des réserves en ATP. Celle-ci ne pourrait pas être compensée, puisque l'utilisation du glycogène se trouve ralentie dans ces conditions.

La membrane cellulaire étant imperméable aux nucléotides cycliques (KJEKSHUS *et al.*, 1971), nous avons utilisé la forme dibutyryl qui, comportant deux radicaux lipophiles, l'un sur la base, l'autre sur le ribose, pénètre facilement dans la couche phospholipidique membranaire (POSTERNAK *et al.*, 1962). Cette forme est ensuite transformée en monobutyryl AMPc, puis en AMPc, sous l'action d'estérases, et peut se fixer sur les récepteurs des protéines-kinases (MEINERTZ *et al.*, 1973). Cependant, l'action du dibutyryl AMPc est beaucoup moins efficace que celle des catécholamines : elle débute lentement et dure plus longtemps, l'étape limitante semblant être la lenteur de la conversion de la forme dibutyryl en la forme monobutyryl (AHREN *et al.*, 1971). A l'issue de 30 min de perfusion hypoxique en présence de dibutyryl AMPc à la concentration de 10^{-4} M, on note une augmentation marquée du contenu tissulaire en AMPc et de la libération de LDH, ainsi qu'une réduction considérable de l'ATP, de la CP et du glycogène. Cet effet semble donc en faveur de l'existence d'une relation entre l'évolution du taux tissulaire d'AMPc au cours de la phase initiale de l'hypoxie, et le degré des altérations cellulaires induites par la privation d'oxygène.

Par ailleurs, l'ensemble de nos résultats pourrait étayer l'hypothèse formulée par HEARSE *et al.* (1978) selon laquelle la surcharge calcique intervenant au cours de l'hypoxie myocardique pourrait expliquer le dommage cellulaire observé dans ces conditions : en effet, l'AMPc favorise l'entrée de calcium par le canal lent (WATANABE et BESCH, 1974) et affecte son accumulation par le réticulum sarcoplasmique (TADA *et al.*, 1975).

En conclusion, les résultats du présent travail suggèrent que les lésions précoces induites par l'hypoxie au niveau du cœur isolé perfusé sans substrat métabolique seraient en partie associées à l'accumulation cellulaire d'AMPc provoquée par la libération des catécholamines endogènes.

BIBLIOGRAPHIE

HRUS K., HJALMARSON A., ISAKSSON O. (1971). Inotropic and metabolic effects on dibutyryl cAMP in the perfused rat heart. *Acta Physiol. Scand., 82,* 79-80.

PPLEMAN M.M., TERASAKI W.L. (1975). Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase. In : *Advances in cyclic nucleotide research,* Vol. 5, ed. by G.L. DRUMMOND, P. GREENGARD and G.A. ROBISON. Raven Press N.Y.

XELROD J., GORDON E., HERTTING G., KOPIN I.J., POTTER L.T. (1962). On the mechanism of trachyphylaxis to tyramine in the isolated rat heart. *Br. J. Pharmacol., 19,* 56-63.

SUTH R.W., PADDOCK R.J., FISHER J.W., GEORGE W.J. (1976). Changes in cyclic nucleotide levels and contractile force in the isolated hypoxic rat heart during perfusion with Glucagon. *Circ. Res., 38,* 162-167.

UTCHER R.W., SUTHERLAND E.W. (1962). Adenosine 3', 5'-phosphate in biological material. Purification and properties of cyclic 3'5' nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3'5'-phosphate in human urine. *J. Biol. Chem., 237,* 1244-1250.

EUVRAY D., DE LEIRIS J. (1975). Ultrastructural modifications induced by reoxygenation in the anoxic isolated rat heart perfused without exogenous substrate. *J. Mol. Cell. Cardiol., 7,* 307-314.

EUVRAY D., JAMES F., DE LEIRIS J. (1980). Effet protecteur de la déplétion des catécholamines endogènes sur l'ultrastructure du cœur isolé de Rat au cours de perfusions hypoxiques de longues durées et après réoxygénation. *J. Physiol., Paris,* à paraître.

AUDUEL Y., KARAGUEUZIAN H.S., DE LEIRIS J. (1979). Deleterious effects of endogenous catecholamines on hypoxic myocardial cells following reoxygenation. *J. Mol. Cell. Cardiol., 11,* 717-731.

OOD C., KRAMER H., SOMOGYI M. (1933). The determination of glycogen. *J. Biol. Chem., 100,* 485.

ORNALL A.G., BARDWILL C.J., DAVID M.M. (1949). Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem., 177,* 751-766.

UTMAN I., WAHLEFELD A.W. (1974). In : *Methoden der Enzymatischen Analyse,* 3rd Edit., Vol. II, p. 1510. H.U. BERGMEYER Ed. Wienheim : Verlag Chemie.

EARSE D.J., HUMPHREY S.M., FEUVRAY D., DE LEIRIS J. (1976). A biochemical and ultrastructural study of the species variation in myocardial cell damage. *J. Mol. Cell. Cardiol., 8,* 759-778.

EARSE D.J., HUMPHREY S.M., BULLOCK G.R. (1978). The oxygen paradox ; two facets of the same problem. *J. Mol. Cell. Cardiol., 10,* 641-668.

EARSE D.J., DE LEIRIS J. (1979). *Enzymes in cardiology,* p. 586. J. Wiley and Sons Ltd, Chichester.

JEKSHUS J.K., HENRY P.D., SOBEL B.E. (1971). Activation of phosphorylase by cyclic AMP without augmentation of contractility in the perfused guinea pig heart. *Circ. Res., 29,* 468-478.

REBS H.A., HENSELEIT K. (1932). Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 210,* 33-66.

RUSE, E., SCHOLZ H. (1978). Effect of theophylline on myocardial adenylate cyclase activity. *Experientia, 34,* 504-505.

UKOVETZ W.R., POCH G. (1969). The action of theophylline, 2-bromo-LSD and imidazole on phosphodiesterase activity in perfused guines pig heart. *Fed. Proc., 28,* 741a.

LAMPRECHT W., STEIN P. (1965). In : *Methods of enzymatic analysis* 2nd edit., 610-616. H.U. BERGMEYER, Ed. Wienheim : Verlag Chemie.

LAMPRECHT W., TRAUTSCHOLD I. (1965). In : *Methods of enzymatic analysis.* 2nd edit., 543-551. H.U. BERGMEYER, Ed. Wienheim : Verlag Chemie.

LANGENDORFF O. (1895). Untersuchungen am über lebender Saugetierherzen. *Pflugers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere 61,* 291-332.

DE LEIRIS J., FEUVRAY D., HERMENS W.T., LOISANCE D. (1977). Myocardial ischaemia and enzyme release. *J. Mol. Med., 2* 183-349.

MEINERTZ T., NAWRATH H., SCHOLZ H. (1973). Influence of cyclisation and acyl substitution on the inotropic effects of adenine nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol., 278,* 165-178.

NAYLER W.G., FASSOLD E., YEPES C. (1978). Pharmacological protection of mitochondrial function in hypoxic heart muscle Effect of verapamil, propranolol and methylprednisolone. *Cardiovas. Res., 12,* 152-161.

NEELY J.R., LIEBERMEISTER H., BATTERSBY E.J., MORGAN M.E. (1967). Effect of pressure development on oxygen consumption by the isolated rat heart. *Am. J. Physiol., 216,* 804-814.

OPIE L.H. (1965). Coronary flow rate and perfusion pressure as determinants of mechanical function and oxidative metabolism of isolated perfused rat heart. *J. Physiol., London, 180,* 529-541.

OPIE L.H. (1969). Metabolism of the heart in health and disease. Part. II. *Am. Heart. J., 77,* 100-122.

POSTERNAK T., SUTHERLAND E.W., HENION W.F. (1962). Derivatives of cyclic 3'5' cAMP. *Biochim. Biophys. Acta, 65,* 558-560.

STEINER A.L., PAGLIARA A.S., CHASE L.R., KIPNIS D.M. (1972). Radioimmunoassay for cyclic nucleotides II. Adenosine 3'5'-monophosphate and guanosine 3'5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids. *J. Biol. Chem., 274,* 1114-1120.

TADA M., KIRCHBERGER M.A., KATZ A.M. (1975). Phosphorylation of a 22 000 dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by cAMP dependent protein kinase. *J. Biol. Chem., 250,* 2640-2647.

WATANABE A.M., BESCH H.R. (1974). cAMP modulation of slow calcium influx channels in guinea pig hearts. *Circ. Res., 35,* 316-324.

WEBER A., HERZ R. (1968). The relationship between the caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. *J. Gen. Physiol., 52,* 750-759.

WEINER N., DRASKOCZY P.R., BURACK W.R. (1962). The ability of tyramine to liberate catecholamines in vivo. *J. Pharmacol., 137,* 47-55.

WOLLENBERGER A., SHAHAB L. (1965). Anoxia-induced release of noradrenaline from the isolated perfused heart. *Nature, 207,* 88-89.

WOLLENBERGER A., RISTAU O., SCHOFFA, G. (1960). Ein einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung grösserer Gewebestücke. *Pflügers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere,* 270, 399-412.

WOLLENBERGER A., KRAUSE E.G., HEIER G. (1969). Stimulation of 3'5' cyclic AMP formation in dog myocardium following arrest of blood flow. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 36,* 664-670.

WROBLEWSKI F., LA DUE J.S. (1955). Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90,* 210-213.

III-B. RESULTATS ET DISCUSSION.

L'état hypoxique de longue durée entraîne l'apparition de lésions cellulaires cardiaques souvent irréversibles (GANOTE et al. 1975). A travers ces résultats, nous formulons l'hypothèse que les catécholamines endogènes prennent une part importante dans le développement des lésions cardiaques induites par la privation d'oxygène.

Nous avions choisi d'objectiver le degré des altérations cellulaires par la quantité de lactate deshydrogénase cellulaire libérée dans le milieu de perfusion. La première phase de libération de LDH observée sur le myocarde hypoxique se développe au moment où la plus grande partie du taux endogène de catécholamines est libérée des sites de stockage. HEARSE et al. (1976) décrivent cette première phase comme étant le résultat d'une altération cellulaire précoce. On peut donc supposer que le premier pic de libération de LDH reflète effectivement l'apparition de lésions dans les cellules hypoxiques sous l'effet des catécholamines endogènes. Il semble par ailleurs que le rôle néfaste de ces catécholamines dépende, tout ou en partie, de l'augmentation du taux tissulaire d'AMP_C.

La seconde phase de fuite de LDH se développe au moment où les cellules cardiaques présentent un déficit énergétique majeur. La réduction notable des taux tissulaires de créatine phosphate et d'adénosine triphosphate, en synergie avec l'effet des catécholamines endogènes, augmente l'altération de l'intégrité cellulaire. Toute situation qui empêche l'effet direct des catécholamines sur la synthèse d'AMP_C à partir d'ATP (réserpine, aténolol, imidazole) prévient également l'effondrement des réserves énergétiques et exerce un effet protecteur sur les cellules hypoxiques.

La cytotoxicité de l'oxygène sur les cellules cardiaques hypoxiques semble dépendre, en partie, de l'état métabolique du myocarde. Cependant, au vue des résultats obtenus avec l'aténolol (GAUDUEL 1978), il s'avère que l'effet nocif de la réoxygénation n'est pas entièrement dépendant de l'état énergétique des cellules au moment du retour en milieu oxygéné. Si l'AMP_C intervient dans le développement des altérations cellulaires induites par l'hypoxie, il n'est pas exclu que ce composé conditionne également l'effet cytotoxique de la réoxygénation.

Nous discuterons de nouveau certains de ces points au chapitre V.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS : ALTÉRATIONS PEROXYDATIVES DU MUSCLE CARDIAQUE RÉOXYGÉNÉ.

IV-A. CONSEQUENCES DE L'HYPOXIE.

Dans le chapitre III, nous avons vu que la privation d'oxygène au niveau d'un coeur perfusé sous substrat métabolique entraîne l'altération de l'intégrité des cellules. Cette altération est caractérisée par une perte de substances cellulaires (notamment des enzymes), consécutive à une augmentation de la perméabilité des membranes. Outre la LDH, la CK est également libérée des cellules hypoxyques avec une cinétique analogue à celle de la LDH (figure 37). Une première phase apparaît dans les trentes premières minutes et une seconde se développe au delà de 45 minutes d'hypoxie. Par ailleurs, la catalase, enzyme partiellement localisée dans la matrice mitochondriale (NOHL et HEGNER 1978) est libérée dans le compartiment extracellulaire au cours de l'hypoxie (figure 37 b).

Parallèlement à l'augmentation des perméabilités membranaires l'hypoxie induit des dommages fonctionnels des mitochondries : diminution de l'activité respiratoire (QO_2 stade 3), découplage de la phosphorylation oxydative dans les trentes premières minutes d'hypoxie et diminution du rapport P/O. Cette détérioration fonctionnelle est une fonction croissante de la durée hypoxique (tableau 7).

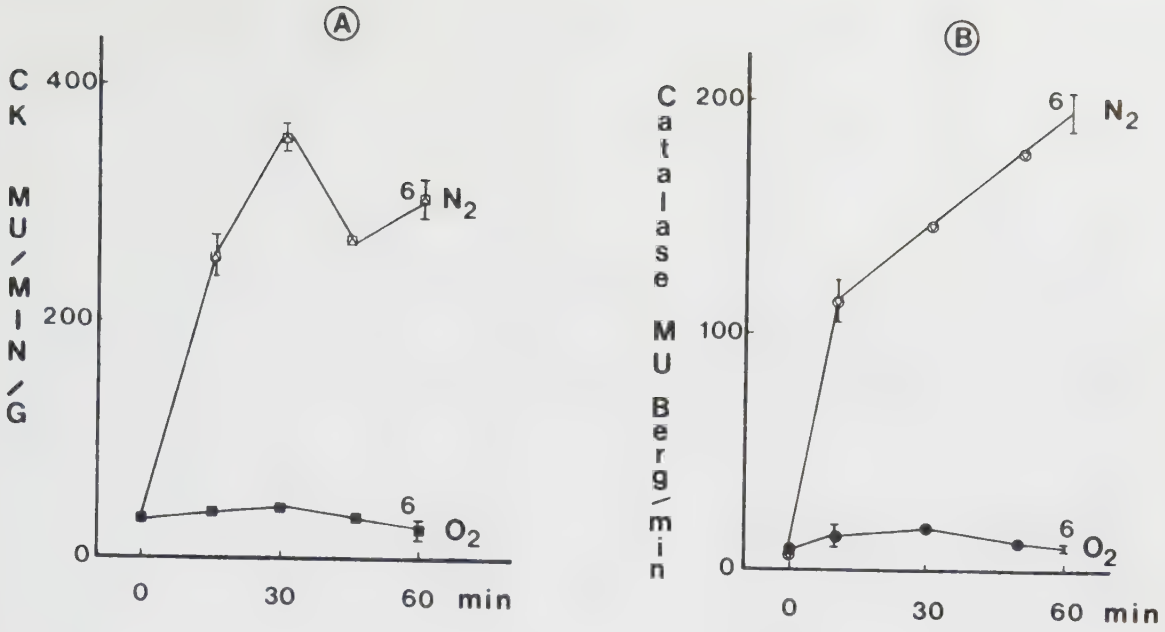


FIGURE 37

Cinétiques de libération de CK et de Catalase
au cours de l'hypoxie myocardique.

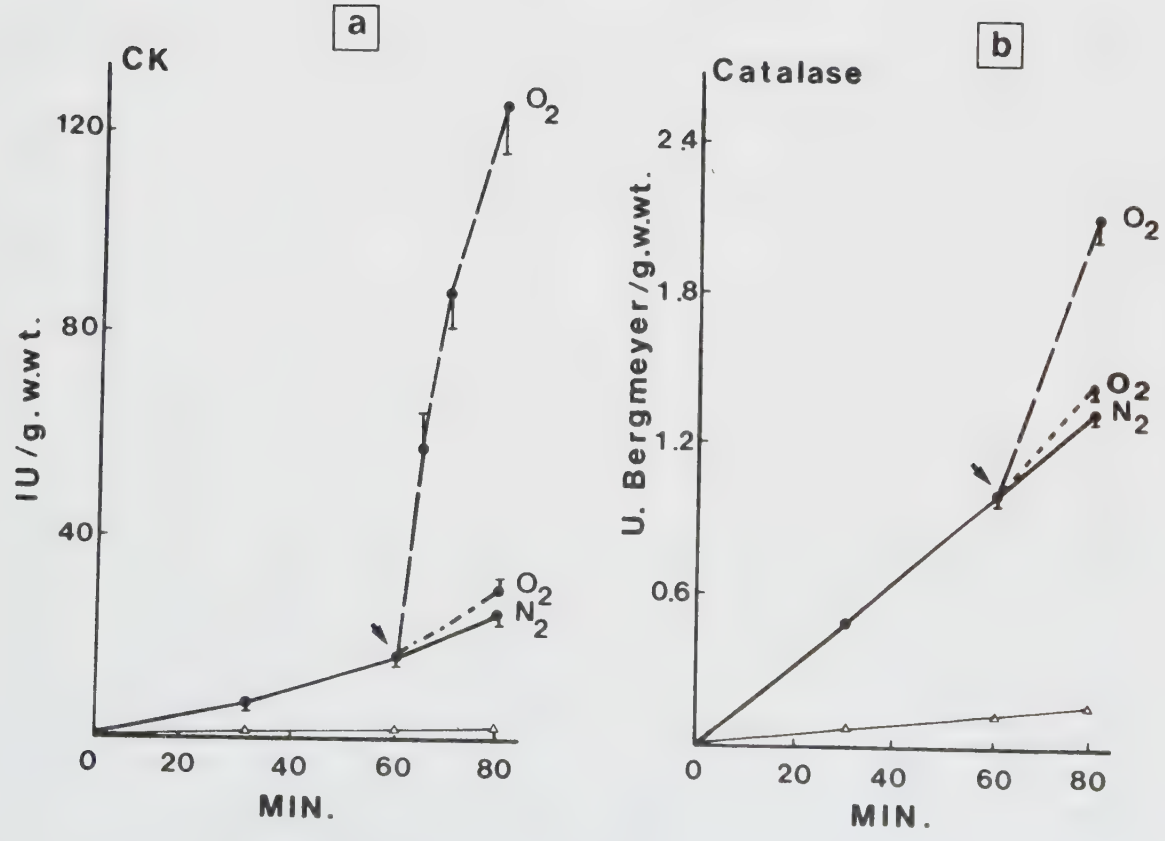


FIGURE 38

Effet de la réoxygénation (PO_2=650 mmHg) sur les
relargages de CK et de catalase.

TABLEAU 7 : PARAMETRES FONCTIONNELS DE MITOCHONDRIES ISOLEES A PARTIR DE COEURS PERFUSES

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 5 EXPERIENCES

Pour chaque durée de perfusion (2) VS (1) * $p < 0.05$ NS : non significatif.

CONDITIONS DE PERFUSION	RCI	QO_2 STADE 3 n Atomes O_2/min/ mg protéine	QO_2 STADE 4 n Atomes O_2/min/ mg protéine	ADP/O
Coeurs non perfusés	15.1 ± 1	132 ± 7	8.7 ± 0.5	3.24 ± 0.09
Aérobie (1) (PO_2 = 650 mm Hg)				
15 min.	14.7 ± 0.30	124 ± 6	8.4 ± 0.7	3.21 ± 0.08
30 min.	14.5 ± 0.25	118 ± 5	8.1 ± 0.6	3.19 ± 0.04
60 min.	13.9 ± 0.40	107 ± 3	7.7 ± 0.3	3.04 ± 0.06
Hypoxie (2) (PO_2 < 3 mm Hg)				
15 min.	11.4 ± 0.34 *	104 ± 2 *	9.4 ± 0.3 NS	3 ± 0.06 *
30 min.	9.4 ± 0.23 *	88 ± 3 *	9.8 ± 0.4 *	2.8 ± 0.07 *
60 min.	5.3 ± 0.16 *	46 ± 1 *	8.9 ± 0.3 *	2.37 ± 0.10 *

La privation d'oxygène entraîne une diminution temporelle du débit coronaire, une accélération de la glycolyse anaérobie et une augmentation de la production glycolytique d'ATP (tableau 8).

En comparaison avec des coeurs maintenus en normoxie, l'hypoxie n'a aucun effet sur la concentration tissulaire de malonaldéhyde. La libération de ce composé dans le compartiment vasculaire reste très faible (tableau 9).

IV-B. CYTOTOXICITE DE LA REOXYGENATION ET PEROXYDATIONS LIPIDIQUES.

La figure 38 montre un effet maintenant bien connu de la réoxygénation. La réadmission d'oxygène sur le muscle cardiaque hypoxique majore considérablement le degré des altérations cellulaires induites par l'hypoxie. Cette cytotoxicité de l'oxygène dépend de la durée de l'hypoxie préalable et de la PO_2 artérielle au moment de la réoxygénation (HEARSE et al. 1978). La libération de CK est optimale sur des coeurs hypoxiques depuis 60 minutes et dont la PO_2 au moment de la réoxygénation est supérieure à 600 mm Hg (tableau 10).

Le dysfonctionnement des mitochondries est également amplifié par la réoxygénation (tableau 11 et figure 39). Il semble que ce soit après seulement 30 minutes d'hypoxie que l'effet toxique de l'oxygène soit le plus important au niveau des mitochondries. En comparaison avec des coeurs non réoxygénés, la réoxygénation induit une diminution de la respiration mitochondriale et une majoration du découplage de la phosphorylation : 11% après 15 minutes d'hypoxie, 35% après 30 minutes et 27 % après 60 minutes.

Contrairement à l'hypoxie, la réoxygénation entraîne une accumulation tissulaire de malonaldéhyde, dont l'importance est déterminée par la durée de l'hypoxie et la valeur de la PO_2 au moment

TABLEAU 8.

EFFET DE L'HYPOXIE SUR LE DEBIT CORONAIRE, LA PRODUCTION DE LACTATE ET LE TAUX D'UTILISATION DE L'ATP.

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 6 EXPERIENCES

Pour les différentes durées de perfusion (2) VS (1) * $p < 0.05$ NS : non significatif

DUREE DE PERFUSION	DEBIT CORONAIRE (ml/min/g)	PRODUCTION DE LACTATE (µmol/30 min/g) (0-30 min)	PRODUCTION DE LACTATE (µmol/30 min/g) (30-60 min)	TAUX D'UTILISATION DE L'ATP (µmol/30 min/g) (0-30 min)	TAUX D'UTILISATION DE L'ATP (µmol/30 min/g) (30-60 min)
Aérobie (1) (PO_2 = 650 mm Hg)					
0 min	13.2 ± 0.3				
15 min	13.5 ± 0.3				
30 min	13.0 ± 0.7	1.8 ± 0.2		0.09 ± 0.007	
60 min	12.7 ± 0.5		2.6 ± 0.3		0.13 ± 0.01
Hypoxie (2) (PO_2 = 3 mm Hg)					
0 min	13.5 ± 0.4 NS				
15 min	13.1 ± 0.8 NS				
30 min	8.5 ± 0.9 *	21 ± 2 *		1.05 ± 0.08 *	
60 min	5.7 ± 0.4 *		17 ± 1.5 *		0.8 ± 0.1 *

TABLEAU 9.

CONCENTRATION TISSULAIRE ET LIBERATION DE MALONALDEHYDE

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 6 EXPERIENCES

Pour les différentes durées de perfusion (2) VS (1) NS : Non significatif.

CONDITIONS DE PERFUSION	MALONALDEHYDE INTRACELLULAIRE n.mol/mg protéine	MALONALDEHYDE LIBERE n.mol/g
Aérobie (1) (PO_2 = 650 mm Hg)		
0 - 15 min.	0.040 ± 0.001	1.8 ± 0.09
0 - 30 min.	0.043 ± 0.002	3.9 ± 0.08
0 - 60 min.	0.045 ± 0.002	6.3 ± 0.12
Hypoxie (2) (PO_2 < 3 mm Hg)		
0 - 15 min.	0.046 ± 0.0015 NS	1.75 ± 0.04 NS
0 - 30 min.	0.050 ± 0.0018 NS	3.45 ± 0.17 NS
0 - 60 min.	0.051 ± 0.003 NS	6.1 ± 0.32 NS

TABLEAU 10.

LIBERATION DE CK (UI/20 min/g)

LES COEURS SONT SOUMIS A DES PERIODES DE REOXYGENATION (20 minutes) AVEC DES PO_2 VARIABLES

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 6 EXPERIENCES

Pour chaque période d'hypoxie (3) (2) VS (1) * $p < 0.05$

Pour chaque PO_2 à la réoxygénation (B) (C) VS (A) ° $p < 0.05$

DUREE DE LA PERFUSION HYPOXIQUE (PO_2 < 3 mm Hg)	VALEUR DE LA PO_2 A LA REOXYGENATION		
	10 mm Hg (1)	150 mm Hg (2)	650 mm Hg (3)
15 min. (A)	3.6 ± 0.15	4.2 ± 0.17 *	9 ± 0.8 *
30 min. (B)	4.5 ± 0.13 °	6.8 ± 0.70 *°	25 ± 1.8 *°
60 min. (C)	5.4 ± 0.30 °	20.3 ± 2.60 *°	110 ± 8 * °

TABLEAU 11.

EFFET DE LA REOXYGENATION (PO_2 = 650 mm Hg) SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 5 EXPERIENCES

(2) VS (1) * $p < 0.05$ NS : non significatif.

CONDITIONS DE PERFUSION	RCI	QO_2 STADE 3 n Atomes O_2/min/mg protéine	QO_2 STADE 4 n Atome O_2/min/mg protéine	ADP/O
Hypoxie (1) (PO_2 3 mm Hg)				
35 min.	8.4 ± 0.25	94 ± 3.8	11.1 ± 0.3	2.65 ± 0.08
50 min.	7.1 ± 0.6	66 ± 3.4	9.2 ± 0.6	2.37 ± 0.10
80 min.	2.6 ± 0.05	17 ± 0.5	6.5 ± 0.2	1.75 ± 0.06
Réoxygénation (2) (PO_2 = 650 mm Hg)				
$15'N_2$ + $20'O_2$	7.48 ± 0.53 *	79 ± 7 *	10.6 ± 0.9 NS	2.8 ± 0.08 NS
$30'N_2$ + $20'O_2$	4.82 ± 0.27 *	60 ± 4 NS	15 ± 0.5 *	1.95 ± 0.05 *
$60'N_2$ ± $20'O_2$	1.9 ± 0.08 *	11 ± 0.3 *	7.2 ± 0.23 *	1.49 ± 0.04 *

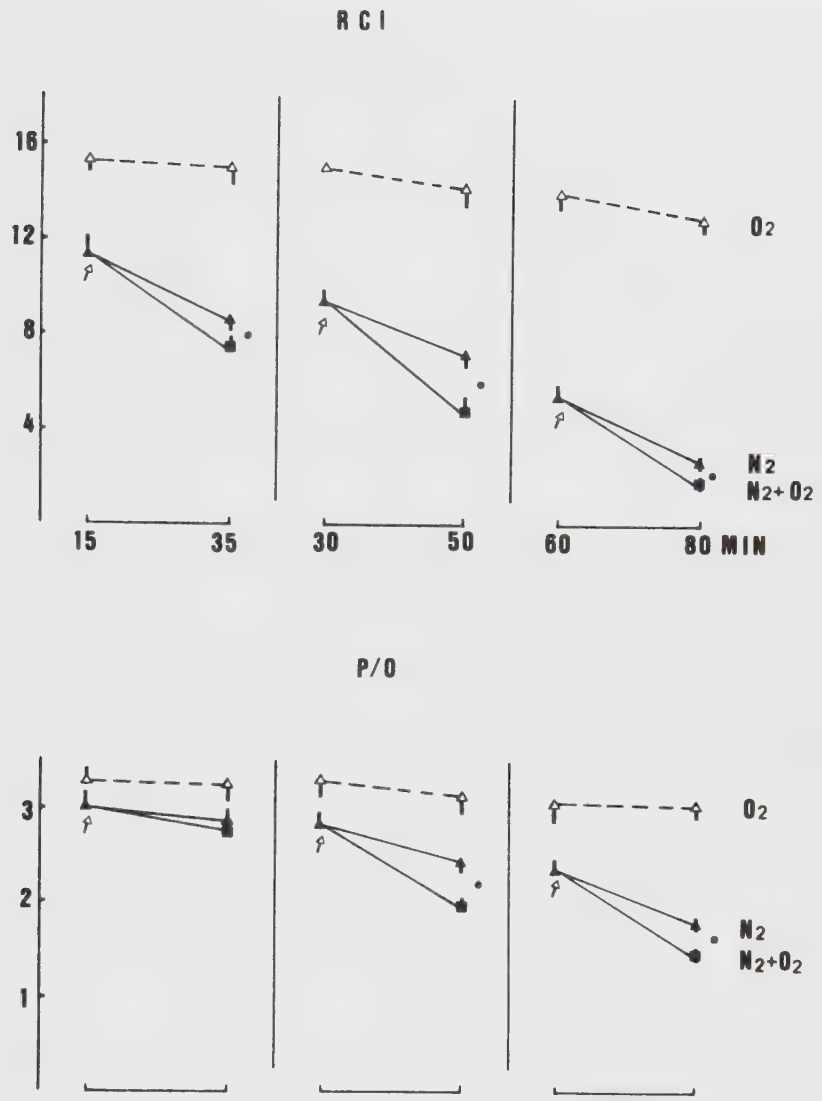


FIGURE 39

Evolution du RCI et du rapport P/O dans différentes conditions de perfusion.

- △ coeurs aérobies, perfusés sans substrat (n=5).
- ▲ coeurs hypoxiques, perfusés sans substrat (n=5).
- ■ coeurs hypoxiques, réoxygènés avec du glucose (11 mM) et une PO_2 > 650 mmHg. La flèche indique le début de la réoxygénation (n=5).

de la réoxygénation (tableau 12). Une libération de MDA est également observée (figure 40 et tableau 12). Au delà de 30 minutes d'hypoxie, la réoxygénation à forte PO_2 est associée à une cinétique biphasique de libération de MDA : une première phase dans les dix premières minutes avec un pic maximum vers 3-4 minutes et une seconde phase, plus lente, qui se développe au delà de 10 minutes de réoxygénation. Pour les différentes conditions de réoxygénation (faible ou forte PO_2), il existe une relation croissante entre le degré des altérations cellulaires et l'accumulation tissulaire de malonaldéhyde (figure 48).

La réoxygénation du myocarde est donc associée à une production anormale de lipides peroxydes objectivée par l'accumulation de malonaldéhyde. Ce composé correspond à une fragmentation de lipides hydroperoxydes. Le dosage du MDA est donc une méthode de choix pour mesurer les produits de peroxydations lipidiques (TAPPEL et ZALKIN 1959). Il semble donc que la réadmission d'oxygène ait un effet direct sur l'initiation de la peroxydation des lipides cardiaques. Ces peroxydations pourraient correspondre à une utilisation anormale de l'oxygène par les cellules hypoxiques.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'influence éventuelle d'espèces anormales de l'oxygène (radicaux) dans l'accélération des peroxydations lipidiques au cours de la réoxygénation. La spécificité de certains antioxydants ou inhibiteurs des radicaux de l'oxygène a été utilisée. Ces spécificités permettent ainsi de disséquer certains des mécanismes complexes qui peuvent induire un effet cytotoxique de l'oxygène sur le myocarde hypoxique.

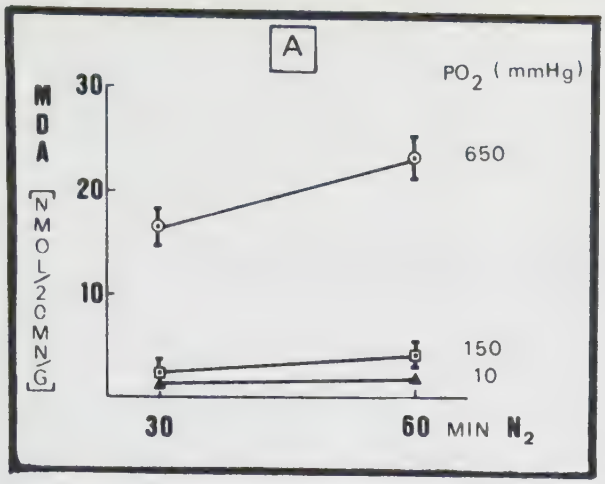
TABLEAU 12.

EFFETS DE LA PO_2 ARTERIELLE SUR L'ACCUMULATION TISSULAIRE DE MALONALDEHYDE

AU COURS DE LA REOXYGENATION

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 5 EXPERIENCES

CONDITIONS DE PERFUSION	PO_2 DURANT LA REOXYGENATION		
	10 mm Hg	150 mm Hg	650 mm Hg
(1) Hypoxie 30 min. + Réox. 20 min. [MDA] n.mol/mg protéine	0.052 ± 0.002	0.061 ± 0.002	0.097 ± 0.003
(2) Hypoxie 60 min. + Réox. 20 min. [MDA] n.mol/mg protéine	0.054 ± 0.003 NS	0.092 ± 0.004 *	0.170 ± 0.005 *



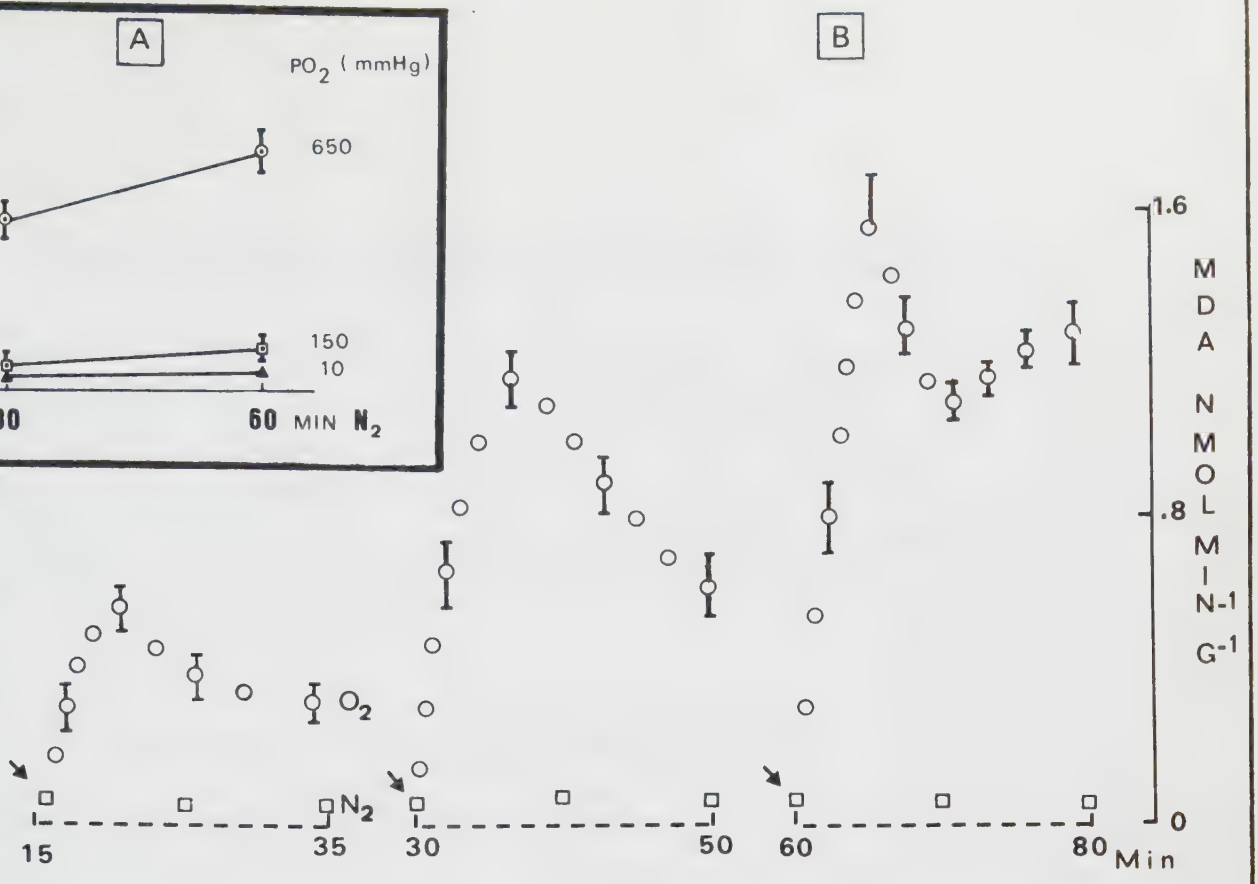


FIGURE 40

A: Effet de la PO_2 de réoxygénation sur la libération de malonaldéhyde. Les coeurs sont soumis à 30 ou 60 minutes d'hypoxie, puis réoxygénés pendant 20 minutes.

B: Cinétiques de libération de malonaldéhyde au cours de réoxygénations de 20 minutes à PO_2 > 650 mm Hg. Les coeurs sont réoxygénés après 15, 30 ou 60 minutes d'hypoxie.

(Chaque point est la moyenne ± SEM de 5 expériences).

IV-C. PEROXYDATIONS LIPIDIQUES ET RADICAUX DE L'OXYGENE.

Ces études ont été effectuées sur des coeurs soumis à des conditions optimales de cytotoxicité de l'oxygène : perfusion hypoxique de 60 minutes en absence de substrat exogène et réoxygénation de 20 minutes en présence de glucose (11 mM), avec une PO_2 de 650 mm Hg. Certaines études ont été complétées par des expériences dont l'hypoxie variait de 15 à 60 minutes.

IV-C. 1 - Radical hydroxyle et singulet oxygène.

Des inhibiteurs du radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), le mannitol, et du singulet oxygène ($1_{\Delta g}O_2$), l'histidine, ont été utilisés à la concentration 10 mM durant les deux dernières minutes d'hypoxie et durant toute la réoxygénation.

Dans ces conditions, le tableau 13 montre que l'accumulation et la libération de MDA sont significativement réduites lors de la réoxygénation. Parallèlement, les altérations cellulaires objectivées par la libération de CK restent limitées (figure 41). Ces altérations sont donc largement dépendantes du degré d'altération des lipides cardiaques (figure 42). Cette observation est confirmée par les résultats obtenus avec un antioxydant inhibiteur des peroxydations lipidiques : la vitamine E (α-tocophérol, sigma) : 14 µM/min. soit environ 70 mg. Lorsque cet antioxydant bloque à 85 % la fuite de MDA, la cytotoxicité de la réoxygénation reste très faible (figure 41 et 42).

En accord avec les travaux de KELLOGGet FRIDOVICH (1977), ces résultats montrent que le radical hydroxyle et le singulet oxygène peuvent être produits lors de la réoxygénation et qu'ils réagissent avec des lipides insaturés pour induire la génération de lipides

TABLEAU 13.

INHIBITION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE AU COURS DE LA REOXYGENATION DE COEURS HYPOXIQUES :

(Hypoxie 60 minutes + réoxygénation 20 minutes PO_2 = 650 mm Hg)

(2) (3) (4) VS (1) * $p < 0.05$

CONDITIONS DE REOXYGENATION	CONCENTRATION TISSULAIRE DE MDA (n.mol/mg protéine)	LIBERATION DE MDA (n.mol/20 min/g)
(1) Coeurs non traités	0.170 ± 0.006	23.4 ± 1.10
(2) Histidine (10 mM) (n = 5)	0.073 ± 0.002 *	12.6 ± 0.35 *
(3) Mannitol (10 mM) (n = 5)	0.064 ± 0.001 *	6.55 ± 0.21 *
(4) α Tocophérol (n = 5)	0.054 ± 0.001 *	3.22 ± 0.12 *

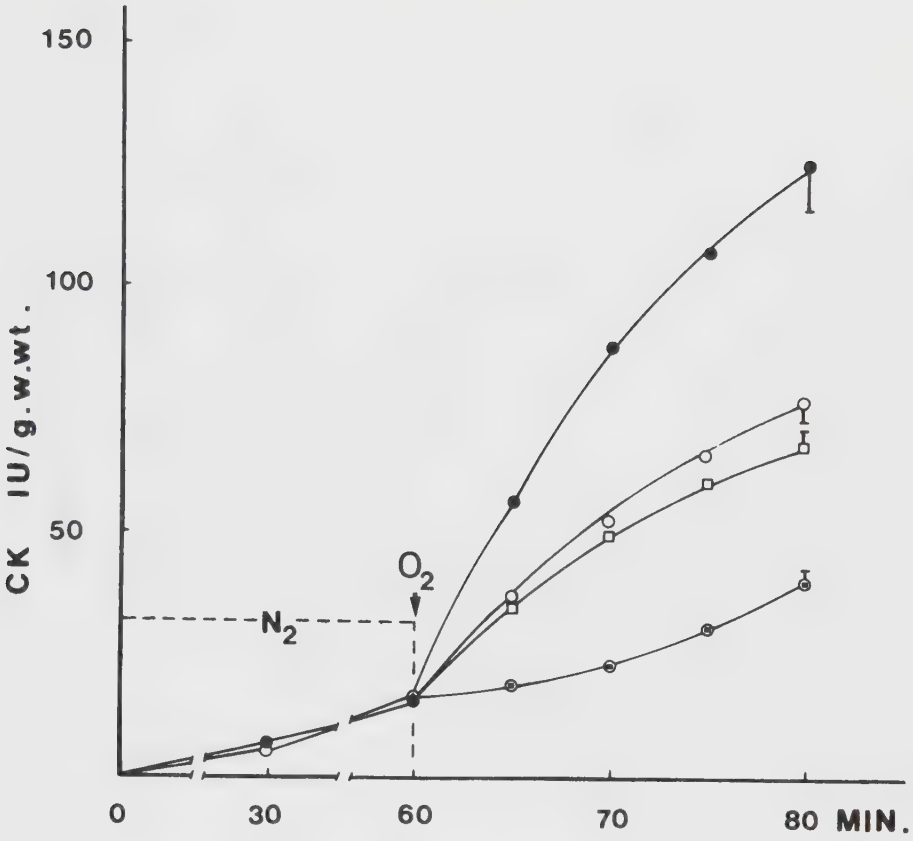


FIGURE 41

Effets protecteurs d'antioxydants sur le muscle cardiaque réoxygèné.

●—● coeurs témoins; ⊙—⊙ réox+ α tocophérol

○—○ réox.+histidine; □—□ réox.+mannitol.

(Pour chaque point expérimental n = 5).

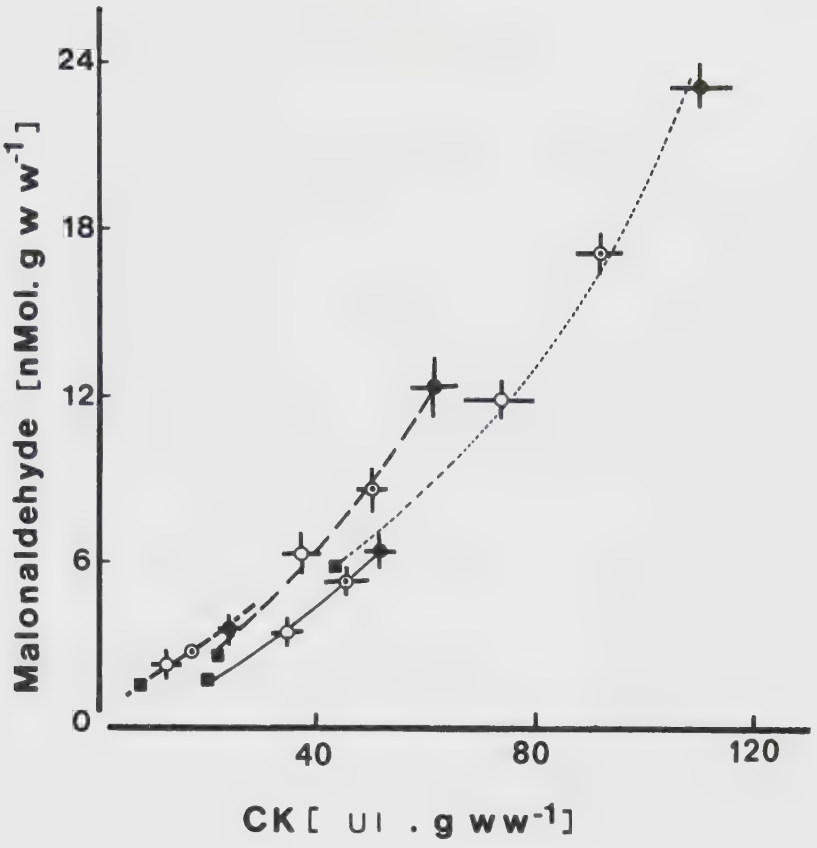


FIGURE 42

Relation entre la quantité de MDA libérée et le degré des altérations cellulaires induites par une réoxygénation.
(Les points, pour chaque groupe, représentent 5 (■) , 10 (○), 15 (⊙) et 20 minutes (●) de réoxygénation).

- - - - - coeurs témoins (n=6)
- - - - réox. + histidine (n=5).
——— réox. + mannitol (n=5).
- - - - réox. +α tocophérol (n=5).

peroxydes (ROO˙), de lipides hydroperoxydes (ROOH) et la fragmentation de ces radicaux en malonaldéhyde.

L'interférence de ces radicaux avec l'attaque peroxydative des cellules cardiaques semble indiquer que d'autres radicaux de l'oxygène peuvent également intervenir. En effet, même si les sources biologiques du radical OH˙ et du singulet $^1\Delta_g O_2$ restent inconnues ou controversées (SPIKES et SWARTZ 1978) certains travaux montrent que ces radicaux peuvent provenir d'espèces induites par la réduction univalente de l'oxygène et plus particulièrement du radical superoxyde O_2^-. (BEAUCHAMP et FRIDOVICH 1970; KEARNS 1971; SPIKES et SWARTZ 1978).

IV-C. 2 - Rôle de l'ion superoxyde.

A dessein de préciser le rôle éventuel de l'ion superoxyde dans le développement des altérations peroxydatives du myocarde réoxygéné, nous avons utilisé la spécificité de la superoxyde dismutase du sang de porc (SOD, Sigma, 3000 V/mg protéine) et un antioxydant hydrophile : le glutathion réduit (GSH, Sigma pur à 98-100 %).

Lorsque ces deux composés sont utilisés pendant l'hypoxie (SOD : 28 unités/minutes, injection totale 2800 U et GSH : 0.5 mM), le décours du débit coronaire n'est pas modifié (tableau 14). Cependant la production de lactate est ralentie et la fuite de CK limitée, surtout en présence de GSH (tableau 14). Afin d'étudier l'effet direct de ces antioxydants au moment de la réoxygénation et d'éviter l'artefact hypoxique, nous avons utilisé la SOD et le GSH uniquement durant les deux dernières minutes d'hypoxie et toute la réoxygénation.

* Altérations cellulaires.

Pour les différentes durées d'hypoxie (15, 30 ou 60 minutes),

TABLEAU 14.

EFFET DU GSH ET DE LA SOD SUR LE MYOCARDE HYPOXIQUE

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 6 EXPERIENCES

(2) (3) VS (1) * $p < 0.05$ NS : non significatif.

CONDITIONS DE PERFUSION	DEBIT CORONAIRE (ml/min/g)	CK mIU /min/g	LACTATE n.mol/min/g	TAUX D'UTILISATION d'ATP µ mol/min/g
Hypoxie 15 min.				
(1) T	14.2 ± 1	253 ± 6	-	-
(2) SOD	14.3 ± 0.8 NS	217 ± 22 NS	-	-
(3) GSH	15.1 ± 0.6 NS	165 ± 12 *	-	-
Hypoxie 30 min.				
T	8.5 ± 0.9 NS	354 ± 27	777 ± 111	1.02 ± 0.08
SOD	7.8 ± 0.8 NS	333 ± 42 NS	541 ± 40 *	0.86 ± 0.03 NS
GSH	8.6 ± 0.8 NS	182 ± 21 *	442 ± 43 *	0.76 ± 0.04 *
Hypoxie 45 min.				
T	6.6 ± 0.7 NS	270 ± 14	-	-
SOD	6.8 ± 0.6 NS	247 ± 30 NS	-	-
GSH	7.4 ± 0.5 NS	271 ± 24 NS	-	-
Hypoxie 60 min.				
T	6.5 ± 0.4 NS	304 ± 24	232 ± 37	0.84 ± 0.1
SOD	5.7 ± 0.4 NS	251 ± 8 *	173 ± 35 NS	0.65 ± 0.06 *
GSH	5.5 ± 0.6 NS	155 ± 16 *	153 ± 21 *	0.55 ± 0.06 *

la figure 43 montre que la SOD et le GSH améliore le débit coronaire au moment de la réoxygénation : le phénomène de non reperfusion est aboli pour les longues hypoxies (60 minutes).Ces antioxydants préservent une partie de l'intégrité des cellules réoxygénées, quelque soit la durée de l'hypoxie préalable (figure 44). En pourcentage ces effets sont nettement plus marqués au delà de 30 minutes d'hypoxie (tableau 15)

* Péroxydations lipidiques et fonction mitochondriale.

La superoxyde dismutase et le glutathion réduit empêchent l'accumulation de malonaldéhyde dans les coeurs réoxygénés (figure 45). Cet effet est significatif quelque soit le degré des altérations cellulaires hypoxiques. Parallèlement, la libération de MDA dans le compartiment vasculaire est réduite en présence de SOD et de GSH (figure 46). Cette réduction s'observe dès les premières minutes de réoxygénation.
En fin de réoxygénation et pour des coeurs hypoxiques depuis 60 minutes, la SOD semble plus efficace que le GSH (figure 47).

Pour les différentes conditions d'hypoxie et de réoxygénation, nous retrouvons une fonction croissante entre l'accumulation tissulaire de MDA et le degré d'altération des cellules objectivé par la fuite de CK (figure 48).

Les études effectuées sur des populations de mitochondries isolées à partir de coeurs réoxygénés sous une forte PO_2 (650 mm Hg) montrent que la SOD et le GSH préservent efficacement les mitochondries contre une altération de la réoxygénation (tableau 16) : maintien de la fonction respiratoire par rapport à des coeurs non réoxygénés. Cette protection est particulièrement nette sur les tracés polarographiques de la figure 49. Ainsi, la toxicité globale du cycle hypoxie-réoxygénation au niveau des mitochondries est réduite par la présence de la SOD et du GSH (figure 50).

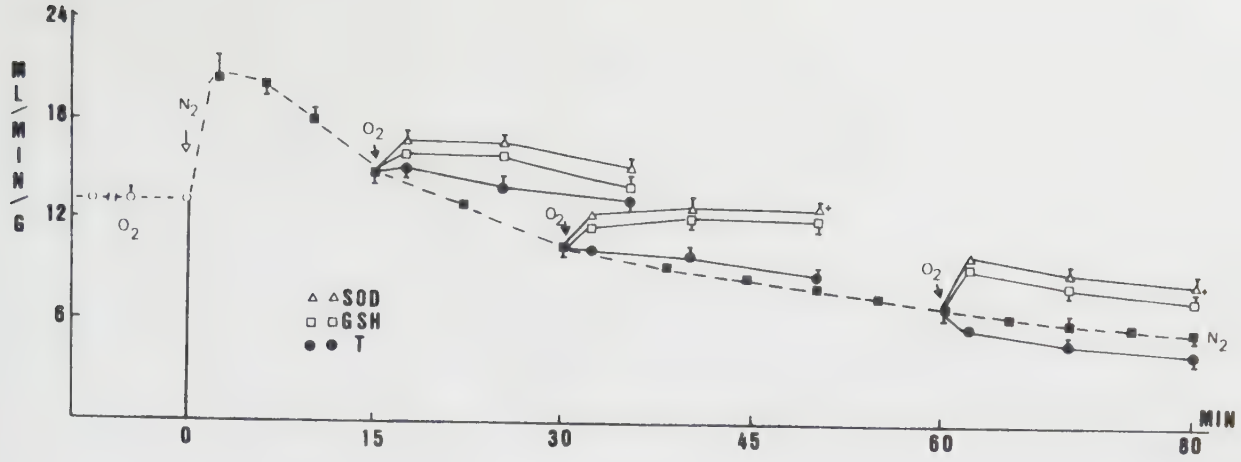


FIGURE 43

Effets de la SOD et du GSH sur le décours du débit coronaire au cours de la réoxygénation.
Pour chaque valeur, n=6 expériences.

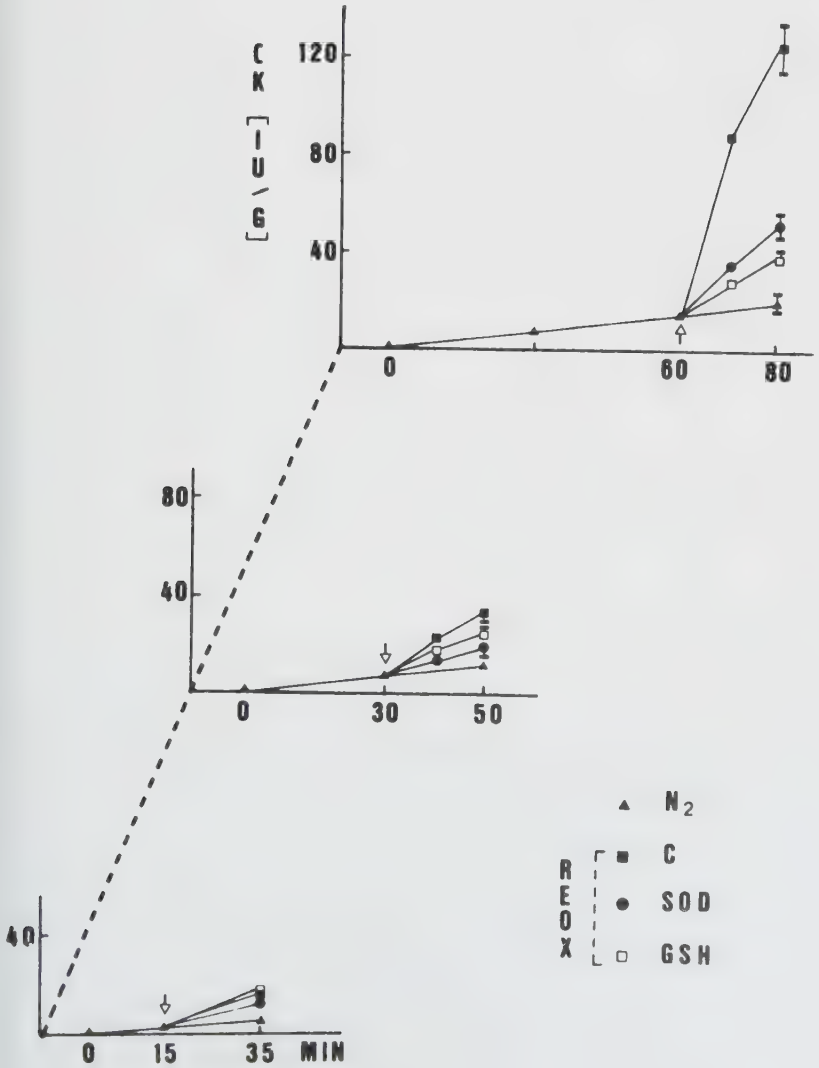


FIGURE 44

Altérations cellulaires induites par la réoxygénation (PO_2=650 mm Hg); Effets de la SOD et du GSH.

Les coeurs sont préalablement soumis à 15, 30 ou 60 minutes d'hypoxie.
Pour chaque groupe, n=6.

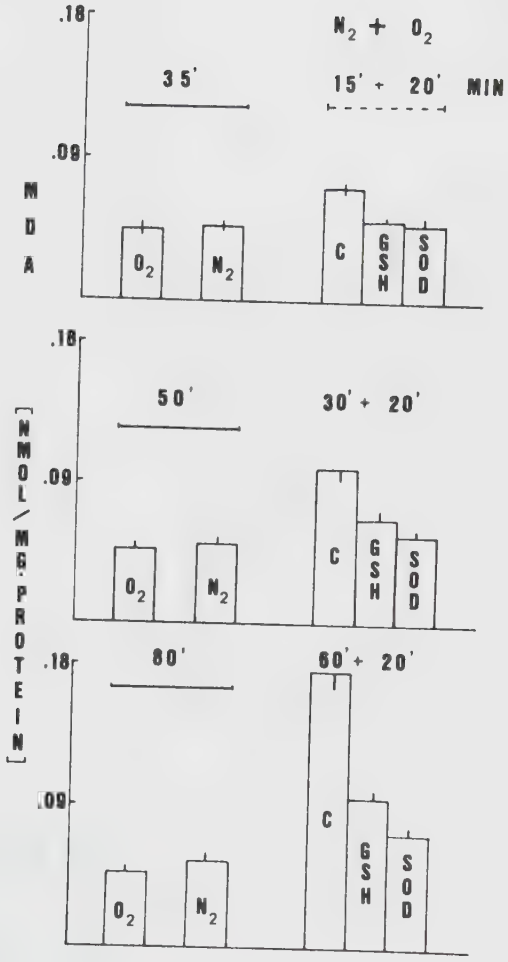


FIGURE 45

Effets de la SOD et du GSH sur l'accumulation tissulaire de MDA au cours de la réoxygénation. (Chaque valeur est la moyenne * SEM de 5 coeurs).

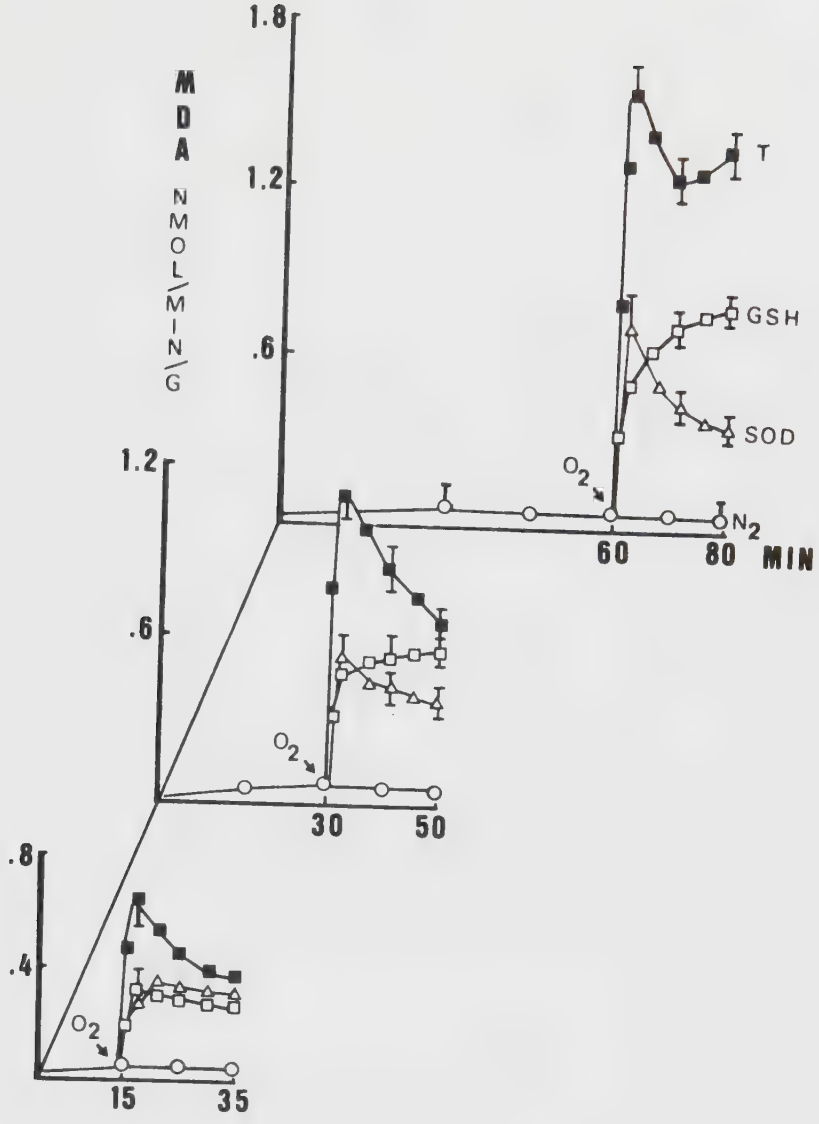


FIGURE 46

Cinétiques de libération de MDA induites par la réoxygénation (PO_2= 650 mm Hg).
(Chaque valeur est la moyenne ± SEM de 5 coeurs).

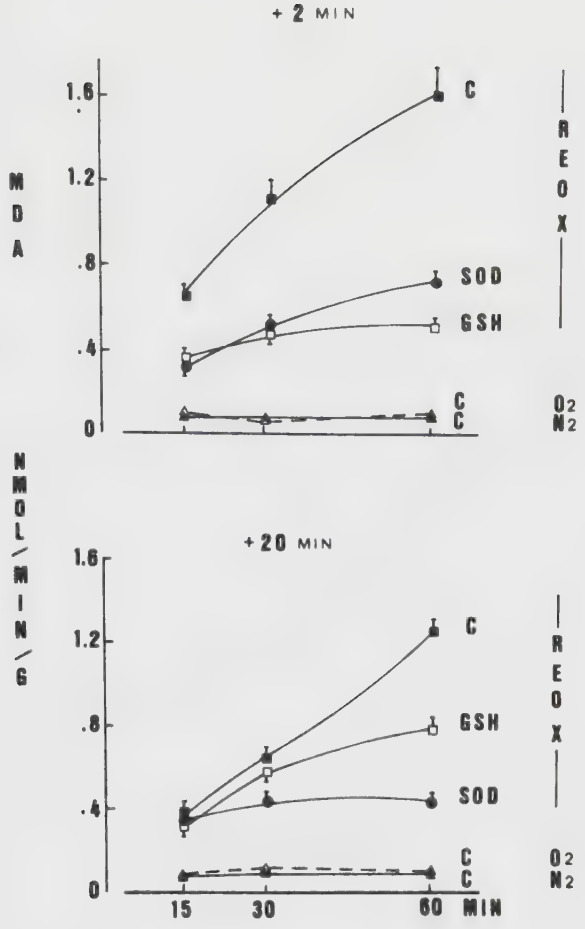


FIGURE 47

Effet de la durée préalable de l'hypoxie sur la libération de MDA après 2 et 20 minutes de réoxygénation (PO_2 650 mm Hg).

Chaque valeur est la moyenne ± SEM de 5 expériences.

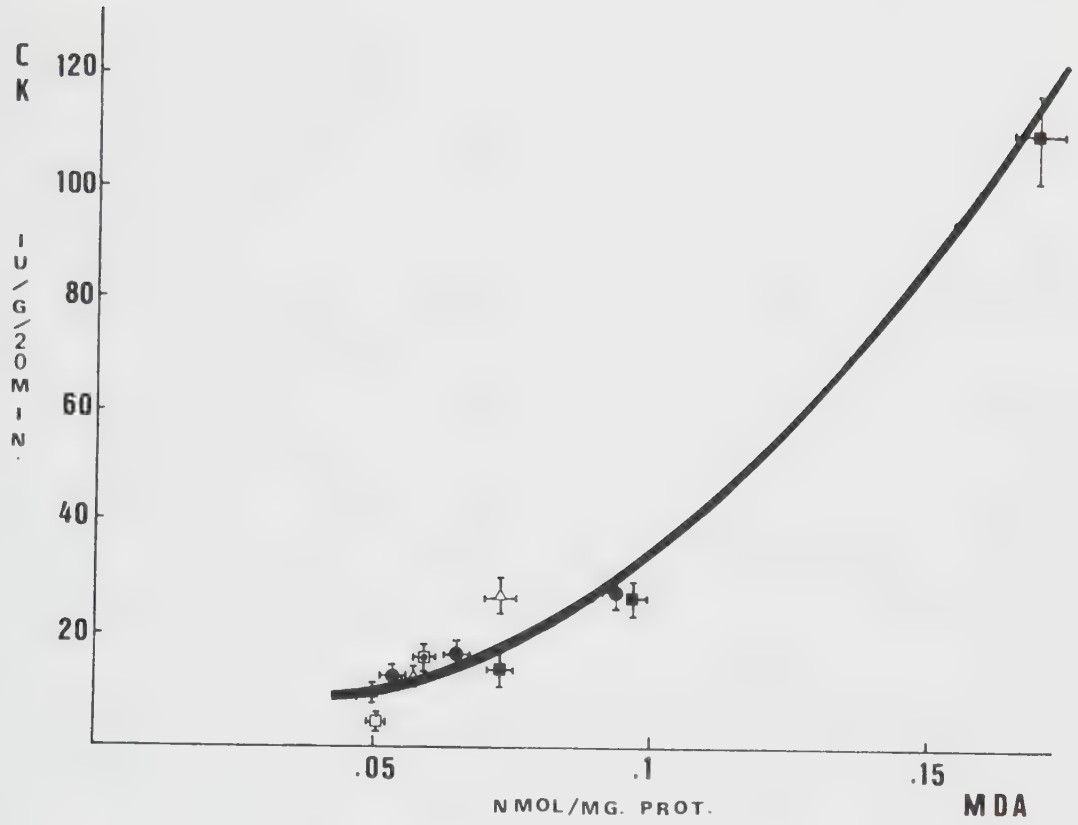


FIGURE 48

Relation entre la concentration tissulaire de MDA et le dégré d'altération cellulaire en fin de réoxygénation.
Les coeurs sont préalablement soumis à 15, 30 ou 60 minutes d'hypoxie.

Réoxygénation PO_2 150 mm Hg après 60 minutes d'hypoxie: ◙
Réoxygénation PO_2 650 mm Hg: ■ témoins
△ SOD
● GSH
Coeurs hypoxiques: 60 minutes. □

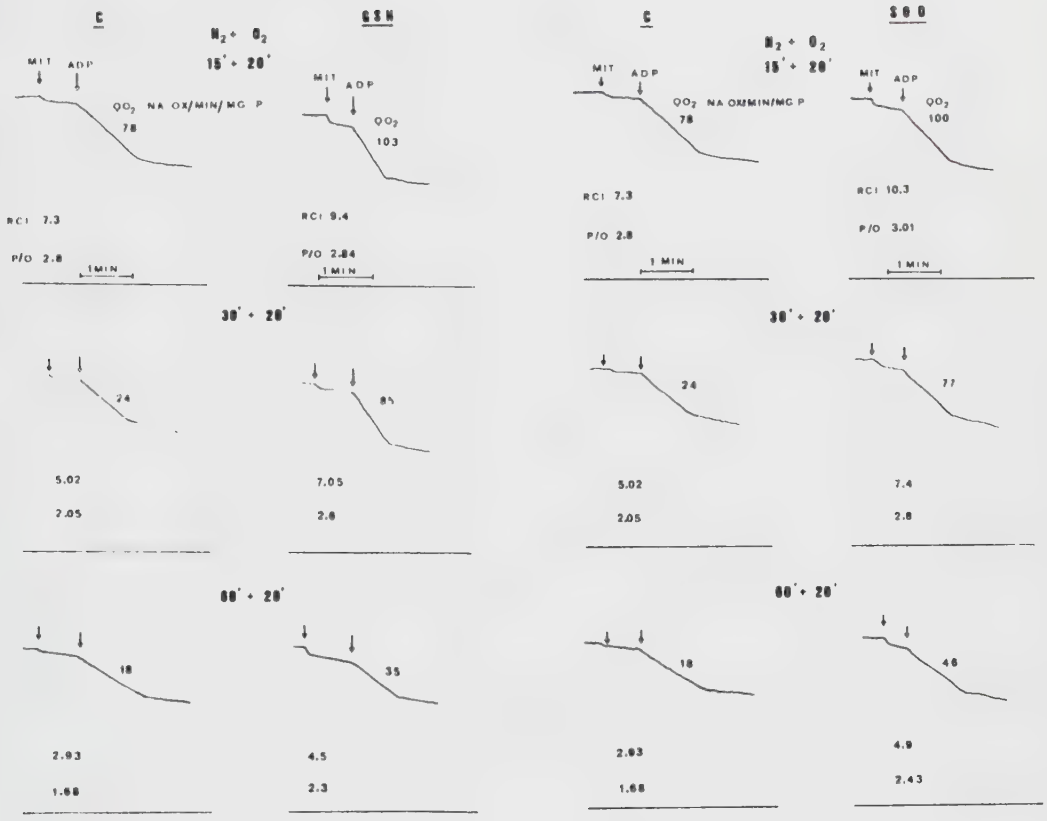


FIGURE 49

Tracés polarographiques obtenus à partir de populations de mitochondries isolées.
Effets du GSH et de la SOD sur les paramètres fonctionnels.

TABLEAU 15.

EFFETS PROTECTEURS DE LA SOD ET DU GSH SUR LES COEURS REOXYGENES

(PO_2 = 650 mm Hg)

LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGES PAR RAPPORT AUX VALEURS TEMOINS (coeurs oxygénés témoins).

L'INTEGRITE CELLULAIRE EST DEFINIE PAR LA QUANTITE DE CK LIBEREE. DURANT LA REOXYGENATION.

CONDITIONS DE PERFUSION	PROTECTION DE L'INTEGRITE CELLULAIRE (en %)	
	REOXYGENATION AVEC SOD (n = 6)	REOXYGENATION AVEC GSH (n = 6)
15 Min. N_2 + 20 Min. O_2	0 - 1	0 - 1
30 Min. N_2 + 20 Min. O_2	50 $\pm$ 2	29.8 $\pm$ 2
60 Min. N_2 + 20 Min. O_2	67.5 $\pm$ 3	78.2 $\pm$ 5

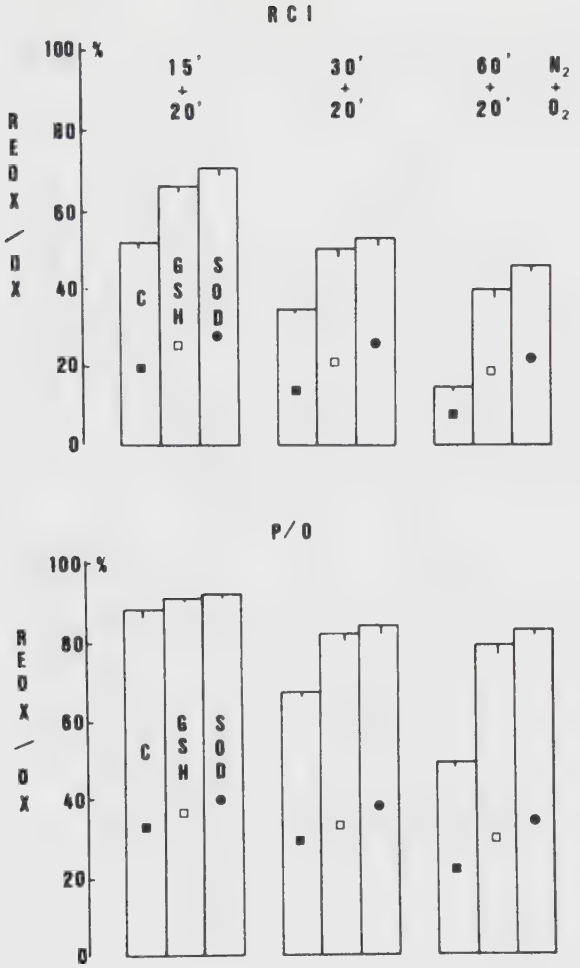


FIGURE 50

Effets de la SOD et du GSH sur la cytotoxicité du cycle hypoxie-réoxygénation au niveau des mitochondries.

Les résultats sont exprimés en % des valeurs témoins : coeurs maintenus en aérobie.
(Pour chaque groupe, n=5).

TABLEAU 16.

EFFETS DE LA SOD ET DU GSH SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE DE COEURS REOXYGENES

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE ± SEM DE 5 EXPERIENCES

(2) (3) VS (1) * $p < 0.05$ NS : Non significatif.

CONDITIONS DE REOXYGENATION (PO_2 = 650 mm Hg)	RCI	QO_2 STADE 3 n.atomes O_2/min/mg protéine	QO_2 STADE 4 n.atomes O_2/min/mg protéine	ADP/O
15 Min N_2 + 20 Min O_2				
1 Réox. témoins	7.48 ± 0.53	79 ± 7	10.6 ± 0.9	2.8 ± 0.08
2 Réox.+SOD	10.2 ± 0.64 *	105 ± 6 *	10.9 ± 0.6 NS	2.95 ± 0.04 NS
3 Réox.+GSH	9.51 ± 0.21 *	107 ± 7 *	11.2 ± 0.9 NS	2.91 ± 0.07 NS
30 Min N_2 + 20 Min O_2				
Réox. témoins	4.82 ± 0.53	60 ± 4	15 ± 0.5	1.95 ± 0.05
Réox.+SOD	7.33 ± 0.28 *	84 ± 7 *	11.2 ± 0.95 *	2.60 ± 0.06 *
Réox.+GSH	6.95 ± 0.39 *	88 ± 6 *	9.2 ± 0.6 *	2.55 ± 0.07 *
60 Min + 20 Min O_2				
Réox. témoins	1.9 ± 0.08	11 ± 0.3	7.2 ± 0.23	1.49 ± 0.04
Réox.+SOD	4.85 ± 0.15 *	40 ± 1 *	6.6 ± 0.16 *	2.53 ± 0.09 *
Réox.+GSH	4.40 ± 0.12 *	35 ± 0.7 *	6.9 ± 0.15 NS	2.47 ∓ 0.10 *

Une relation étroite entre l'indice du contrôle respiratoire (RCI) et la concentration tissulaire de malonaldéhyde peut être dégagée de cette étude (figure 51). Pour les différentes conditions de réoxygénation (coeurs témoins, coeurs réoxygénés avec SOD ou GSH), l'augmentation tissulaire de MDA est associée à une diminution du contrôle de l'activité respiratoire par l'ADP (RCI). De plus, l'activité des enzymes mitochondriales , estimée par QO_2 st.3 est dépendante de la teneur tissulaire en MDA (figure 52).

Ainsi, toute inhibition ou ralentissement de la peroxydation des lipides au cours de la réoxygénation est associée à une préservation de la fonction mitochondriale. La figure 53 résume les effets de la SOD et du GSH sur la fonction mitochondriale et la peroxydation lipidique des coeurs réoxygénés sous PO_2 650 mm Hg pendant vingt minutes. Exprimés en pourcentages, ces résultats montrent que l'effet de la SOD ou du GSH est d'autant plus important que la durée de l'hypoxie préalable est longue. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que ces antioxydants pénètrent mieux dans les cellules altérées par de longues hypoxies. En conséquence, la protection s'en trouve renforcée au moment de la réoxygénation.

IV-D. MITOCHONDRIES ET CYTOTOXICITE DE LA REOXYGENATION.

Dans le paragraphe III-B.1, nos études montrent que le degré des altérations de la fonction mitochondriale au cours de l'hypoxie est une fonction croissante de la durée hypoxique. La figure 54 montre que l'effet cytotoxique de l'oxygène sur les mitochondries est conditionné par l'état fonctionnel de celle-ci au moment de la réoxygénation. Tout se passe comme si la reprise de l'activité respiratoire amplifiait les altérations fonctionnelles des mitochondries et conditionnait la cytotoxicité de la réoxygénation.

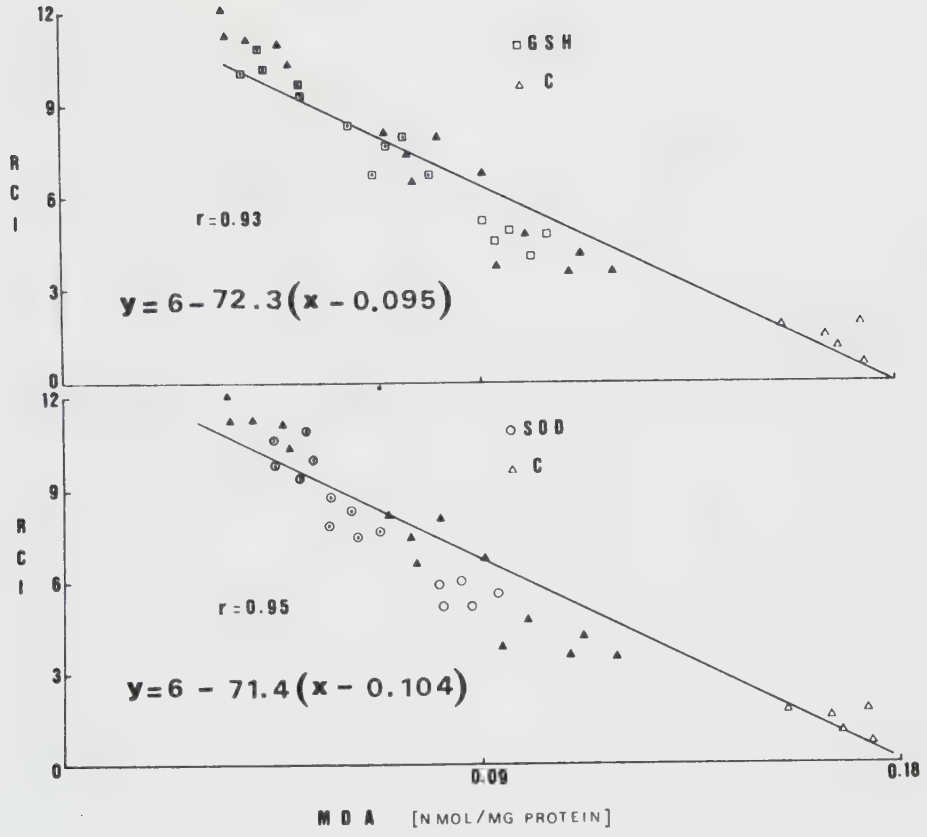


Figure 51

Relation linéaire entre l'indice de contrôle respiratoire des mitochondries et la concentration tissulaire de MDA.

▲ ▲ coeurs en aérobie PO_2 : 650 mm Hg

▲ ▣ ⊙ $15'N_2 + 20'O_2$ (PO_2 : 650 mm Hg)

▲ ▣ ⊙ $30'N_2 + 20'O_2$ (PO_2 : 650 mm Hg)

△ □ ○ $60'N_2 + 20'O_2$ (PO_2 : 650 mm Hg)

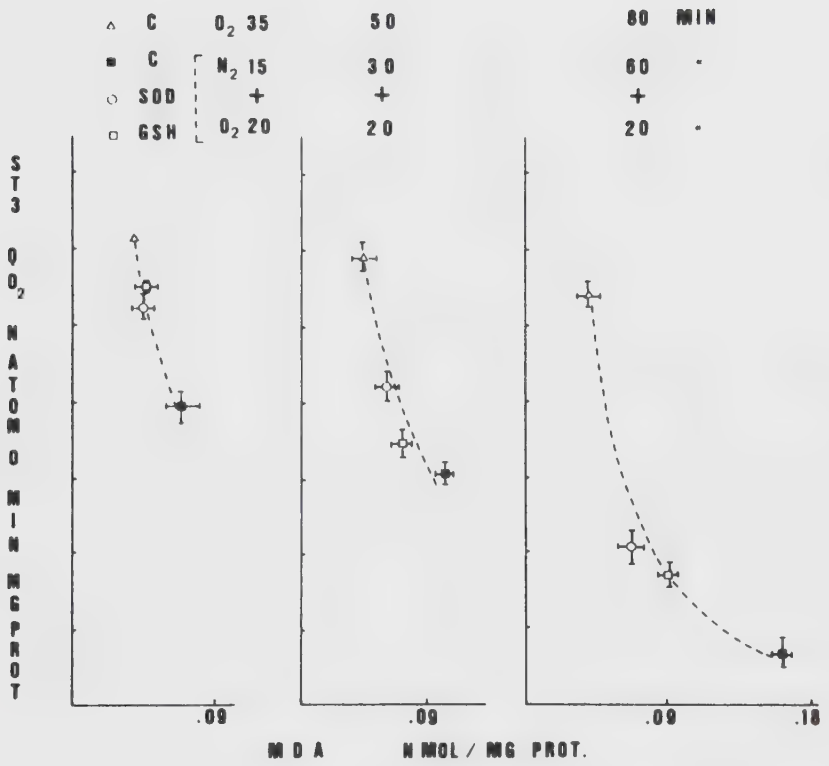


FIGURE 52

Relation entre l'activité respiratoire (QO_2 stade 3) des mitochondries et la concentration tissulaire de MDA.

(Chaque point est la moyenne ± SEM de 5 coeurs: c= coeurs témoins; GSH= coeurs réoxygénés avec du GSH; SOD= coeurs réoxygénés avec de la SOD).

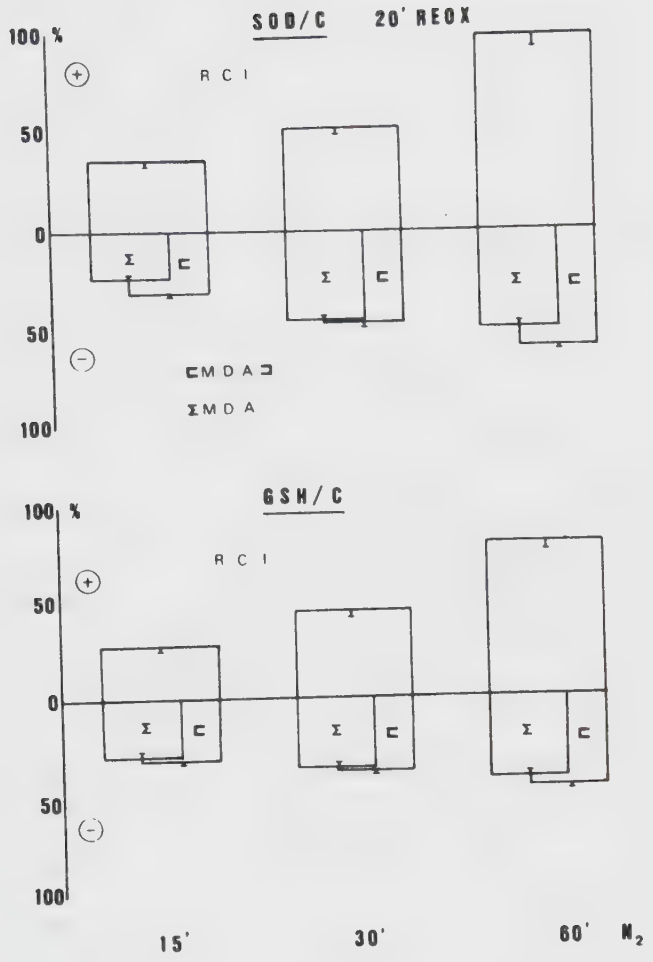


Figure 53

Effets protecteurs comparés du GSH et de la SOD sur le muscle cardiaque réoxygéné.

RCI = Indice de contrôle respiratoire.

[MDA] = Concentration tissulaire de malonaldéhyde.

Σ MDA = Taux cumulé de MDA libéré pendant la réoxygénation (PO_2 = 650 mm Hg, 20 minutes).

Les résultats sont exprimés en % par rapport à des coeurs témoins.
Chaque valeur est la moyenne $\pm$ SEM de 5 expériences.

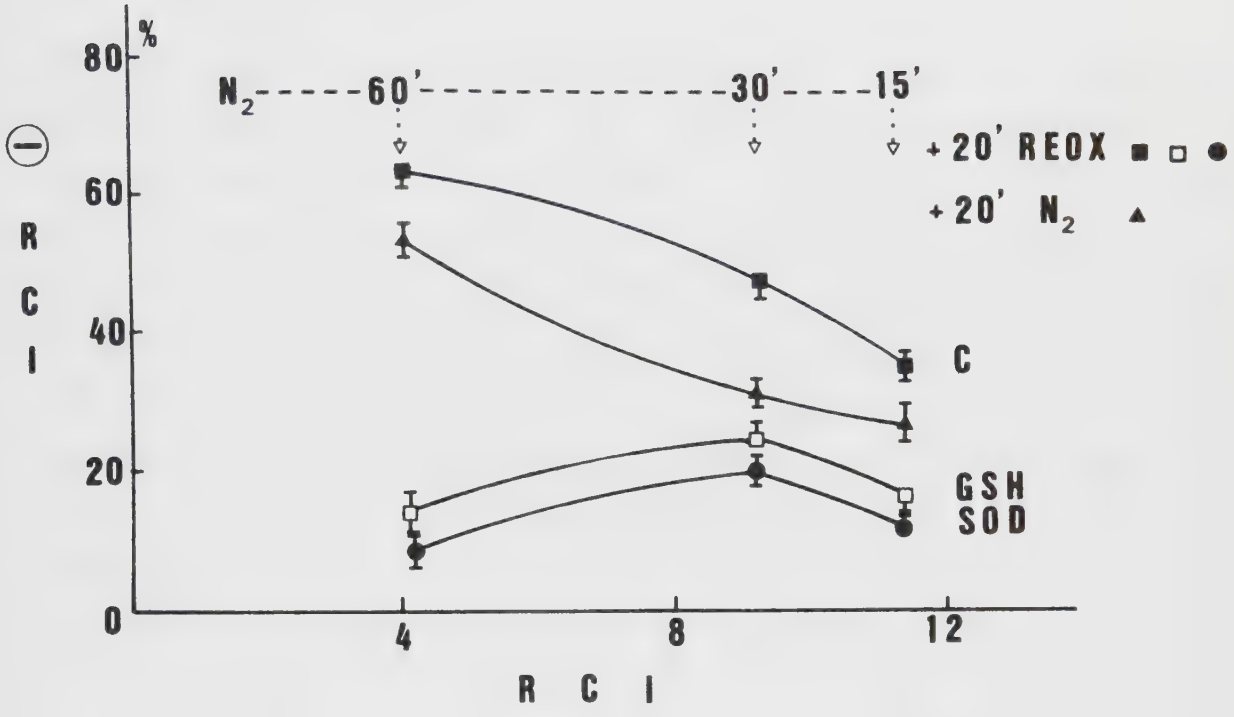


FIGURE 54

Relation entre la valeur du RCI au moment de la réadmission d'oxygène et le pourcentage d'altération de ce paramètre après 20 minutes de réoxygénation (PO_2:650 mm Hg).

(Chaque point est la moyenne ± SEM de 5 expériences).

Nous avons donc étudié l'incidence de la respiration mitochondriale sur l'attaque peroxydative des lipides cardiaques à la réoxygénation. Pour cela, au moment de la réoxygénation, la respiration mitochondriale est bloquée par du monoxyde de carbone (5%) au niveau de la cytochrome oxydase aa_3 ou par de la roténone (100µM) entre NADH déshydrogénase et l'ubiquinone, figure 29.

Les résultats de la figure 55 montrent que l'accumulation tissulaire de malonaldéhyde peut être significativement réduite dans les coeurs dont la respiration mitochondriale est inhibée au moment de la réadmission d'oxygène. Les effets du monoxyde de carbone et de la roténone sont observés quelque soit la durée de l'hypoxie préalable. Pour de fortes PO_2 au moment de la réoxygénation (650 mm Hg) l'altération péroxydative des lipides est également limitée sur des coeurs soumis à des hypoxies de longue durée (figure 56 a). Parallèlement aux inhibitions des péroxydations de lipides cardiaques, le blocage de la chaine respiratoire empêche l'exacerbation des altérations cellulaires provoquée par la réoxygénation (figure 56 b).

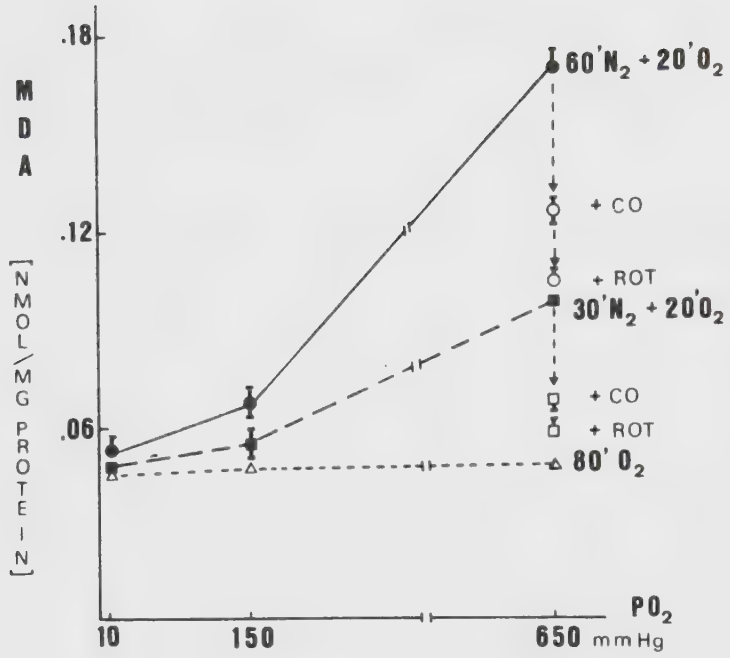


Figure 55

Effets du blocage de la respiration mitochondriale par la roténone et le monoxyde de carbone sur l'accumulation tissulaire de malonaldéhyde au cours de la réoxygénation.

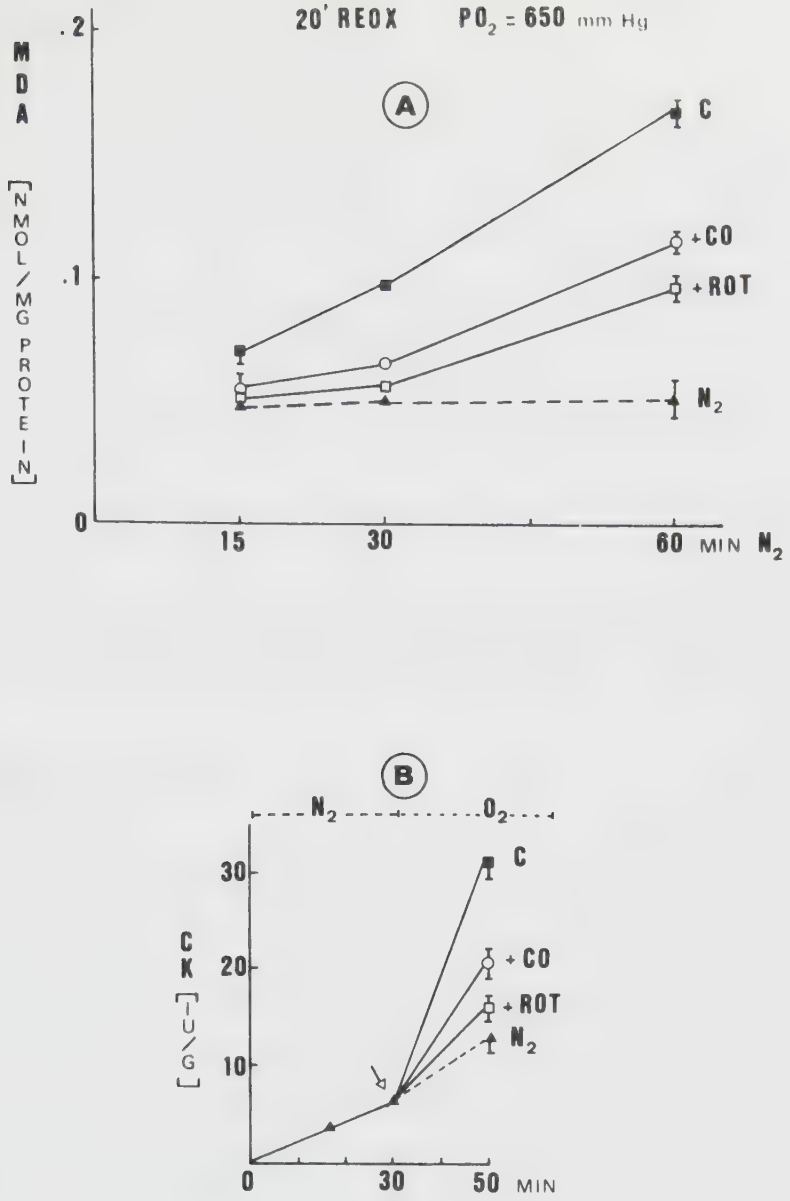


Figure 56

a) Inhibition de la production de malonaldéhyde dans les coeurs réoxygénés par blocage de la respiration mitochondriale.

b) Réduction des altérations cellulaires induites par une réoxygénation (PO_2 = 650 mm Hg). Effet du monoxyde de carbone et de la roténone.

CHAPITRE V.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Dans ce chapitre nous discuterons l'ensemble des résultats relatifs à la cytotoxicité de l'oxygène sur le myocarde hypoxique.

V-A. INTRODUCTION.

Le muscle cardiaque hypoxique présente une intolérance vis à vis de l'oxygène moléculaire. Cette intolérance est dépendante de la durée préalable de la période hypoxique et de la PO_2 de réoxygénation. Tout se passe comme si les cellules hypoxiques étaient incapables de métaboliser normalement cet oxygène. Pour un certain nombre d'auteurs (HEARSE et CHAIN 1972 ; HEARSE et al.) (GANOTE et al. 1975), cette incapacité serait influencée par la déplétion sévère des réserves énergétiques (ATP, CP). En dessous d'un seuil critique, l'appauvrissement de la réserve en ATP ou CP induirait une altération de l'intégrité des cellules hypoxiques et conditionnerait la cytotoxicité de la réoxygénation.

Nos résultats démontrent que les catécholamines endogènes influent sur le degré des altérations cellulaires induits par l'hypoxie et conditionnent l'intolérance du myocarde envers la réoxygénation.

En accord avec les travaux de MURAD et al. (1969); ROBINSON et al. (1965); CHEUNG et WILLIAMSON (1965), la libération des catécholamines de leurs sites de stockage stimule le système adénylcyclase des membranes cellulaires et augmente le taux intracellulaire d'AMP_c. Cette étude confirme, par ailleurs, les travaux de BUSUTTIL et al. (1976) qui avaient observé une augmentation tissulaire de 3',5'AMP_c au cours des premières minutes d'une hypoxie du myocarde. Dans ces conditions, les altérations cellulaires induites par une privation d'oxygène seraient sous la dépendance d'une accumulation cellulaire de 3', 5' AMP_c associée à un effondrement simultané des réserves énergétiques (ATP,CP) et glycolytiques.

Si l'oxygène moléculaire, en tant que substrat exogène, a un effet cytotoxique sur le myocarde hypoxique, cela revient à considérer les cellules cardiaques hypoxiques comme incapables d'utiliser l'oxygène par la seule voie tétravalente de la chaîne respiratoire mitochondriale. Nos résultats permettent d'établir que les catécholamines endogènes sont impliquées, directement ou indirectement, dans les processus cytotoxiques de la réoxygénation (figure 58).

V-B. PEROXYDATIONS LIPIDIQUES ET REOXYGENATION.

La toxicité de l'oxygène sur le myocarde hypoxique étant dépendante de la PO_2 artérielle (HEARSE et al. 1978), il est probable qu'il existe une action directe de l'oxygène dans les altérations cellulaires induites par la réoxygénation.
L'effet de la PO_2 sur les atteintes peroxydatives des lipides cardiaques est particulièrement net au moment de la réoxygénation.
En accord avec les travaux de GUARNIERI et al. (1980), l'importance des peroxydations lipidiques est modulée par la durée de l'hypoxie. Pour une PO_2 physiologique (150 mm Hg), l'altération peroxydative des lipides ne devient significative que sur des coeurs soumis à une hypoxie de longue durée (60 minutes).

L'intolérance du coeur hypoxique envers l'oxygène se traduirait par une autoxydation des acides gras insaturés. Cette conclusion est en accord avec les travaux de CALDARERA et al. (1978), MEERSON et USTINOVA (1982). Lorsque les réactions de peroxydation sont totalement bloquées par un antioxydant hydrophobe, l'α-tocophérol, les altérations cellulaires induites par l'oxygène sont minimes, même sous forte PO_2.

Puisque les peroxydes lipidiques peuvent réagir avec des protéines et entraîner la dénaturation de celles-ci (ROUBAL et TAPPEL, 1966 a, b), il est probable que l'attaque peroxydative des lipides entraîne une altération de l'intégrité des membranes cellulaires. Cette hypothèse est confirmée : i) par la relation qui existe entre l'accumulation tissulaire de malonaldéhyde et le taux de CK libéré au moment de la réoxygénation, ii) par l'effet protecteur de l' α-tocophérol qui, en s'interposant entre les lipides membranaires, empêche l'atteinte peroxydative des acides gras insaturés, la dénaturation des protéines (TAPPEL et ZALKIN, 1950 a, b; PRYOR 1966; DEMOPOULOS et al. 1972; HALLIWELL 1978) et préserve l'intégrité membranaire des cellules cardiaques réoxygénées.

V-C. ROLE DES RADICAUX DE L'OXYGENE AU COURS DE LA REOXYGENATION.

D'une manière générale, il y a de plus en plus de présomptions pour que les dommages cellulaires irréversibles induits par l'oxygène moléculaire soient associés à une production anormale de radicaux de l'oxygène (ALLEN et al. 1973; HAUGAARD 1978). Ces radicaux, nous l'avons vu au premier chapitre, sont produits par des cellules dont le métabolisme oxydatif est perturbé (HAUGAARD 1978; NOZAKI et al. 1982).

La cellule cardiaque hypoxique présente des déficiences de certains systèmes régulateurs du métabolisme de l'oxygène

(GUARNIERI et al. 1980) ; diminution de l'activité de la glutathion peroxydase et de la superoxyde dismutase, appauvrissement des réserves tissulaires de GSH et de protéines à groupement thiol. La diminution de l'activité tissulaire de la SOD, l'inhibition de cette enzyme par une forte PO_2 (RISTER et BAEHNER 1976)ou son inactivation par un excès d'ion superoxyde (SINET et GARBER 1981) sont autant de facteurs susceptibles d'entraîner une production anormale d'espèces actives de l'oxygène dans les cellules réoxygénées. Le coeur hypoxique présente également une perte de l'activité cellulaire de la catalase puisque cette enzyme est libérée dans le compartiment vasculaire.

Dans ces conditions, nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle l'altération peroxydative des lipides cardiaques serait induite par l'utilisation anormale de l'oxygène par les cellules hypoxiques. Cette utilisation anormale serait favorisée par l'altération des mécanismes oxydatifs impliqués dans la régulation du métabolisme de l'oxygène.

Des antioxydants enzymatiques comme la SOD ou la catalase (résultats présentés dans l'annexe) n'ont aucun effet sur le myocarde hypoxique. Ce fait est un accord avec la théorie de PRYOR (1966). Les radicaux de l'oxygène ne jouent pas de rôle prépondérant dans les cellules hypoxiques. En revanche, le GSH exerce un effet protecteur sur le myocarde hypoxique. Cet effet est probablement lié à une intéraction de ce tripeptide avec la glygénolyse ou la glycolyse anaérobie. La préservation de la réserve cellulaire de glycogène peut expliquer l'augmentation de la résistance du myocarde à une atteinte hypoxique.

Le choix d'étudier plus spécialement les effets de la SOD et du GSH sur le myocarde réoxygéné est justifié par le fait que ces deux antioxydants exercent, de manière différente, des rôles fondamentaux dans la régulation du métabolisme de l'oxygène (FRIDOVICH.

1975; KOSOWER et KOSOWER 1976). La superoxyde dismutase permet d'accélérer la dismutation de l'ion O_2^- par un facteur 10^4 et le glutathion réduit agit comme coenzyme de la glutathion peroxydase ou comme antioxydant hydrophile du compartiment ionique et aqueux des cellules (DEL MAESTRO 1980).

Quelque soit la durée de l'hypoxie, la SOD et le GSH réduisent les altérations cellulaires induites par la réoxygénation et préserve efficacement le débit coronaire en empêchant le phénomène de non reperfusion *. Parallèlement, l'attaque peroxydative des lipides est largement inhibée. L'effet du GSH peut être dû à une augmentation du rapport cellulaire GSH/GSSG. Ce rapport est fondamental dans la régulation du métabolisme oxydatif (KOSOWER et KOSOWER 1976), dans le contrôle des mouvements ioniques (KOSOWER et KOSOWER 1974) et de la contraction musculaire (KOSOWER 1970). Cet apport exogène de GSH contrebalance la déplétion induite par l'hypoxie et, utilisé par des transférases ou la glutathion peroxydase, il favoriserait la décomposition des lipides hydroperoxydes (ROO$^\cdot$) ou de l'hydrogène peroxyde (H_2O_2) : HALLIWELL, 1974; KOSOWER et KOSOWER 1976. Cette dernière hypothèse est confirmée par l'effet protecteur qu'exerce la catalase sur la peroxydation lipidique des coeurs réoxygénés (GAUDUEL et DUVELLEROY 1983 a). Cette enzyme exerce un rôle important dans le métabolisme de l'hydrogène peroxyde (JONES et al. 1981). L'intervention directe ou indirecte de ce radical dans l'altération peroxydative des cellules réoxygénées n'est pas à exclure. Il semble probable que l'intervention de H_2O_2 dans la cytotoxicité de l'oxygène passe par une interaction avec d'autres radicaux; (Réaction type FENTON par exemple). Nous reviendrons sur ce point au cours de la discussion.
En accord avec les travaux de ZIMMERMAN et al. (1973), la SOD s'avère être un inhibiteur de la peroxydation lipidique induite par la réoxygénation.

* En anglais : "No reflow" phenomenon.

Bien que l'intervention de l'ion O_2^- dans les processus de peroxydation lipidique soit encore controversée (KASCHNITZ et HATEFI 1975; SVINGEN et al. 1978; THOMAS et al. 1978), nos résultats montrent que ce radical est déterminant dans la cytotoxicité de la réoxygénation. Ce radical participerait à la catalyse des peroxydations et à la propagation de celles-ci. Dans cette hypothèse, la première phase de libération de MDA correspondrait à une surcharge rapide de lipides peroxydes dès que l'oxygène est réadmis dans les cellules. Il n'est pas exclu d'autre part, que ce pic de libération soit majoré par l'apparition de contractures cellulaires aboutissant à des ruptures membranaires. Si la réoxygénation est maintenue au delà de 10 minutes, la seconde phase de libération de MDA pourrait correspondre à une propagation des chaînes de peroxydations dans les différentes structures membranaires.

Parmi les autres radicaux de l'oxygène susceptibles d'interférer avec la peroxydation lipidique au cours de la réoxygénation, le radical hydroxyle ($OH^\cdot$) et le singulet oxygène ($1\ {}_{\Delta g}O_2$) ont été pris en considération.Il a en effet été proposé que la dismutation spontanée de O_2^- libèrerait des singulets oxygène (KHAN 1970) au même titre qu'une réaction type HABER-WEISS (KELOGG et FRIDOVICH 1975, 1977). Ces concepts sont actuellement très discutés (SPIKES et SWARTZ 1978). Il en est de même pour les origines biologiques du radical hydroxyle (KOPPENOL et al. 1978; DEL MAESTRO 1980). Cependant depuis les travaux de FONG et al. (1973); KELLOGG et FRIDOVICH (1977), ces espèces actives de l'oxygène seraient impliquées dans la génération de lipides peroxydes et de lipides hydroperoxydes. Le mannitol, chélateur du radical hydroxyle (SPIKES et SWARTZ 1978) réduit la cytotoxicité de la réoxygénation. Cet effet ne peut être dû à un mécanisme osmotique, puisqu'il est utilisé à faible concentration. D'autre part le contenu tissulaire en eau, estimé par le rapport PF/PS n'est pas significativement modifié en fin de réoxygénation : (témoin 5.76 ± 0.06; mannitol 5.67 ± 0.08).

En bloquant la production de $OH^{\cdot}$, la libération de MDA s'en trouve réduite. Ces résultats indiquent donc que $OH^{\cdot}$ peut être compromis dans l'attaque peroxydative des coeurs réoxygénés, puisqu'il est un réactif des composés organiques (DORFMAN et ADAMS 1973).

D'autre part, l'effet protecteur de l'histidine, un chélateur spécifique de $^1\Delta_g O_2$ (SPIKES et SWARTZ 1978), renforce l'idée que la réoxygénation entraîne une activation anormale de l'oxygène moléculaire. Au cours de la dismutation de O_2^-, et en association avec lui, le singulet est susceptible de favoriser la propagation des peroxydations lipidiques (KELLOGG et FRIDOVICH 1975; SUGIOKA et NAKANO 1976; SVINGEN et al. 1978) ou de produire d'autres radicaux cytotoxiques à partir de la fragmentation des lipides hydroperoxydes (HAWCO et al. 1977). Ce rôle du singulet oxygène en biologie est possible, d'autant qu'en 1980, 1981, CADENAS et al., par une technique de chemiluminescence auraient identifié la présence du singulet oxygène dans des réactions de peroxydations lipidiques induites. Il n'est pas exclu, qu'en dehors de son action sur les lipides cardiaques, ce radical puisse intervenir dans la dégradation de protéines cellulaires au moment de la réoxygénation.

Ainsi, par l'intermédiaire de radicaux, l'oxygène moléculaire participe aux attaques peroxydatives de la réoxygénation. Cette toxicité de l'oxygène sur les cellules hypoxiques inclut la production de l'ion superoxyde et probablement celle du radical hydroxyle par le biais d'une réaction type FENTON (CZAPSKI et ILAN 1978). Le blocage de cette réaction par une accélération de la dismutation de O_2^- ou par la dégradation de H_2O_2 entraîne une diminution de la production du radical $OH^{\cdot}$ et une réduction des altérations cellulaires induites par l'attaque peroxydative des lipides cardiaques.

V-D. ROLE DES MITOCHONDRIES AU MOMENT DE LA REOXYGENATION.

En dehors de l'altération des membranes cellulaires, la réoxygénation induit une majoration des altérations structurales des mitochondries (HEARSE et al. 1975; FEUVRAY et DE LEIRIS 1975, GANOTE et al. 1979). Ces dommages sont associés à des troubles fonctionnels : diminution de l'activité respiratoire, découplage respiration-phosphorylation (LOSCHEN et al. 1975; GANOTE et al. 1980). Durant la réoxygénation, l'oxygène moléculaire est d'autant plus toxique pour les mitochondries que la fonction respiratoire est perturbée par l'hypoxie préalable. Cette graduation de la toxicité de l'oxygène peut être interprétée i) comme une action directe des lipides peroxydes produits au cours de la réoxygénation; Ces peroxydes sont en effet de puissants inactivateurs des enzymes mitochondriales (OTTOLENGHI et al. 1959); NOHL et HEGNER 1978) et des découpleurs de la phosphorylation oxydative (WATANABE et NAKAMMA 1979; AUGUSTIN et al. 1979). ii) comme une réaction d'autolyse liée à la production de radicaux de l'oxygène au sein de la chaîne respiratoire. Au vu des résultats obtenus avec la SOD et le GSH, ces deux processus peuvent intervenir simultanément. En effet, la SOD et le GSH augmentent la tolérance des mitochondries hypoxiques envers l'oxygène. Il est intéressant de noter que, dans ces conditions, l'on retrouve une étroite corrélation entre l'intensité du couplage respiration-phosphorylation et la concentration tissulaire de lipides peroxydes. Cette corrélation confirme l'existence d'une interaction entre l'activité respiratoire des mitochondries et les phénomènes de peroxydations lipidiques (AUGUSTIN et al. 1979).

Cette interaction semble faire intervenir les radicaux de l'oxygène puisque la SOD et le GSH agissent simultanément sur la fonction mitochondriale et sur les peroxydations lipidiques. De plus, ce résultat est peut être en rapport avec le fait que la mitochondrie est probablement la plus importante source de O_2^- dans les cellules (SVINGEN et al. 1979).

Tout se passe comme si, au cours de la réoxygénation, les mitochondries participaient activement à l'attaque peroxydative des lipides en produisant, elles-mêmes, des radicaux de l'oxygène. En retour, les lipides peroxydes formés affecteraient la fonction mitochondriale et induiraient le gonflement des mitochondries.

A dessein de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'importance de la respiration mitochondriale dans l'attaque peroxydative des lipides lors de la réoxygénation.

Le blocage de la respiration par la roténone ou le monoxyde de carbone empêche l'accumulation tissulaire de lipides peroxydes et réduit le degré des altérations cellulaires. En bloquant l'activité respiratoire des mitochondries entre la NADH déhydrogénase et l'ubiquinone, la roténone inhibe la production d'hydrogène peroxyde et d'ion superoxyde à partir du complexe NADH-ubiquinone réductase (BOVERIS et CHANCE 1973; CADENAS et al. 1977; FORMAN et BOVERIS 1982). Dans ces conditions, puisque la concentration tissulaire de malonaldéhyde est réduite en présence de roténone, on peut conclure à une intervention de la respiration mitochondriale dans la peroxydation des lipides de cellules cardiaques réoxygénées. Cette conclusion est confirmée par les résultats obtenus avec le monoxyde de carbone et est en accord avec les travaux de HEARSE et al. (1978), GANOTE et al. (1976). Ces auteurs observent une réduction de l'effet cytotoxique de l'oxygène en bloquant la chaîne respiratoire par du cyanure ou de l'amylobarbitone. L'un des premiers évènements qui favoriserait la cytotoxicité de la réoxygénation serait la réoxydation de la chaîne de transfert des électrons. La reprise d'une activité subphysiologique de la chaîne induirait une altération des membranes mitochondriales et une production de radicaux de l'oxygène dans le compartiment cytosolique (NARABAYASHI et al. 1982). Dans cette hypothèse, il serait explicable que l'intensité des peroxydations et le degré des altérations cellulaires soient proportionnels avec la PO_2 puisque la production mitochondriale de radicaux

de l'oxygène (O_2^- et H_2O_2) est modulée par cette PO_2 (BOVERIS et CHANCE 1973; BOVERIS 1977; CHANCE et BOVERIS 1978).

De nombreux composants de la chaîne respiratoire peuvent être impliqués dans la production de radicaux de l'oxygène ou dans la formation de lipides peroxydes : pyridines nucléotides, flavoprotéines,ubiquinone, protéines non hémiques, cytochromes. L'autoxydation de l'ubiquinone semble être la principale source de production d'hydrogène peroxyde : FORMAN et BOVERIS 1982. Notre modèle expérimental est trop complexe pour envisager l'ensemble des mécanismes mitochondriaux susceptibles d'induire une production d'espèce active de l'oxygène. Des modèles expérimentaux simplifiés sont utiles pour disséquer les mécanismes : isolement de complexes, reconstitution d'unités fonctionnelles. La peroxydation des lipides avec production associée de malonaldéhyde peut être obtenue à partir de fractions submitochondriales de coeurs de porc mises en présence de NADH ou NADPH (TAKAYANAGI et al. 1980) ou par l'association de NADH ubiquinone réductase (complexe I) et d'un complexe ADP-Fe^{3+} (TAKESHIGE et al. 1980). Les études mettent clairement en évidence l'initiation des peroxydations lipidiques par la NADH déshydrogénase de la chaîne respiratoire (BOVERIS et al. 1978; TAKESHIGE et MINAKAMI 1979; TURRENS et BOVERIS 1980). La réduction du complexe ADP-Fe^{3+} est une étape essentielle dans cette initiation.

De telles anomalies du métabolisme de l'oxygène sont favorisées par une réactivité de l'oxygène avec les composants de la chaîne qui se trouvent à l'état réduit. Cette situation peut être transposable avec celle des cellules hypoxiques rapidement placées dans un environnement aérobie.

Le complexe enzymatique NADH déshydrogénase est producteur d'ions superoxydes (RICH et BONNER 1978) au même titre que le complexe ubiquinone-cytochrome b. Ce dernier complexe est inhibé

par un blocage du site sensible au cyanure. Ce résultat démontre que plusieurs systèmes de production des radicaux de l'oxygène peuvent intervenir simultanément dans l'initiation directe ou indirecte des peroxydations lipidiques. De telles peroxydations entraineraient, secondairement, une altération des composants de la membrane interne des mitochondries et un dysfonctionnement de la chaîne de transfert des électrons, principalement au niveau du site compris entre la NADH déshydrogénase et l'ubiquinone (NARABAYASHI et al. 1982) , Figure 57.

Au delà de leur caractère simplifié, ces modèles peuvent permettre de reproduire des conditions identiques à celles des cellules cardiaques réoxygénées.

V-E. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.

Le rôle des radicaux de l'oxygène dans la cytotoxicité de la réoxygénation n'est pas en contradiction avec les résultats d'autres études (HEARSE 1977 a, HEARSE et al. 1978; GANOTE et al. 1975; 1980 GANOTE et KALTENBACK 1979; STEWART et al 1983). Ces auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle la cytotoxicité de la réoxygénation serait associée à un déclenchement de flux rapides de calcium à l'intérieur de la cellule. Au niveau des mitochondries, la reprise de l'activité de la chaîne de transfert d'électrons entrainerait une captation massive de calcium par ces organites subcellulaires.

Ces flux de calcium entraînerait la lyse des membranes mitochondriales (PARR et al. 1975), l'activation de certaines lipases ou phospholipases (SCARPA et LINDSAY 1972) et une acidification du compartiment cytoplasmique (GANOTE et KALTENBACH 1979; ALTSCHULD et al. 1981). Par ailleurs, l'accumulation cytoplasmique de calcium libre favoriserait la contracture des sarcomères au moment où les cellules peuvent avoir une faible production d'ATP associée à une reprise de l'activité respiratoire (HEARSE 1978; GANOTE et KALTENBACH 1979; GANOTE et al. 1980).

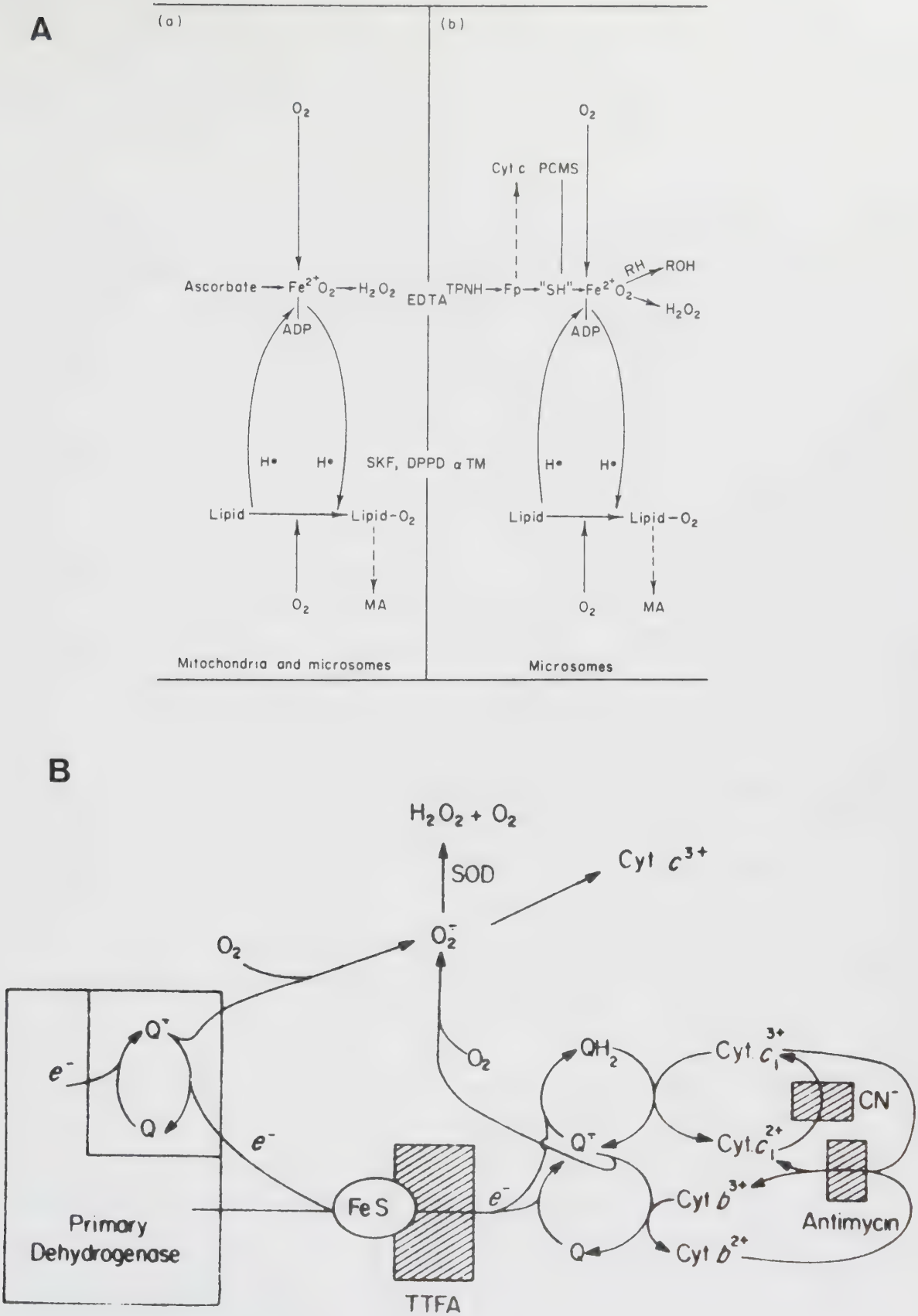


FIGURE 57

a. Hypothèses sur les mécanismes enzymatiques et non enzymatiques de peroxydation des lipides insaturés.
b. Hypothèse sur le mécanisme de formation de O_2^- à partir de l'ubiquinone.

Cette accumulation de calcium dans le cytoplasme hypoxique peut être favorisée, du moins en partie, par l'intervention des catécholamines endogènes. FLECKEINSTEIN (1971)décrit, sous l'influence des catécholamines, l'apparition de surcharges calciques dans le muscle cardiaque. En étant libérées de leurs sites de stockage sous l'effet de l'hypoxie, les catécholamines pourraient favoriser les surcharges calciques par le biais du 3', 5' AMP_C. Le 3', 5' AMP_C augmenterait les échanges calciques dans les différents compartiments cellulaires (ENTMAN et al. 1969; NAYLER et al. 1970), favorise l'entrée de calcium par le canal lent (WATANABE et BESCH 1974), affecte l'accumulation de calcium par le réticulum sarcoplasmique (TADA et al. 1975). Dans cette hypothèse d'une intervention calcique, au moment de la réoxygénation, il n'est pas exclu que les lipides peroxydes et les radicaux de l'oxygène contribuent à perturber les répartitions d'ions dans les cellules ou augmenter la fragilité des membranes lysosopales. En effet, HESS et al.(1981) ont mis en évidence l'influence des radicaux de l'oxygène sur l'activité de certains principes du réticulum sarcoplasmique.

D'autre part, la production de l'ion superoxyde dans les mitochondries modifie la résistance de celles-ci vis à vis d'une captation excessive de calcium (HARRIS et al. 1982).

En conclusion, nous proposons donc l'hypothèse résumée par la figure 58. L'effet toxique de l'oxygène sur le muscle cardiaque hypoxique serait associé à une réoxydation anormale de la chaîne respiratoire mitochondriale. La réoxydation de la chaîne de transfert des électrons, plus ou moins altérée par une hypoxie, entraînerait une production de radicaux de l'oxygène et catalyserait la peroxydation des lipides membranaires. Ce métabolisme anormal de l'oxygène serait favorisé ou amplifié par la déficience des systèmes antioxydants cellulaires (GSH/GSSG, peroxydases, SOD, catalase) et par la diminution du pH intracellulaire. En synergie avec ces attaques peroxydatives, des mouvements calciques anormaux entre

les différents compartiments cellulaires (cytosol, réticulum sarcoplasmique, mitochondries) induiraient le développement des altérations de l'intégrité cellulaire : activation des phospholipases, contracture ou lyse des myofilaments, gonflement et éclatement des mitochondries, mouvement d'eau avec oedème cellulaire, rupture des membranes cellulaires.

.../...

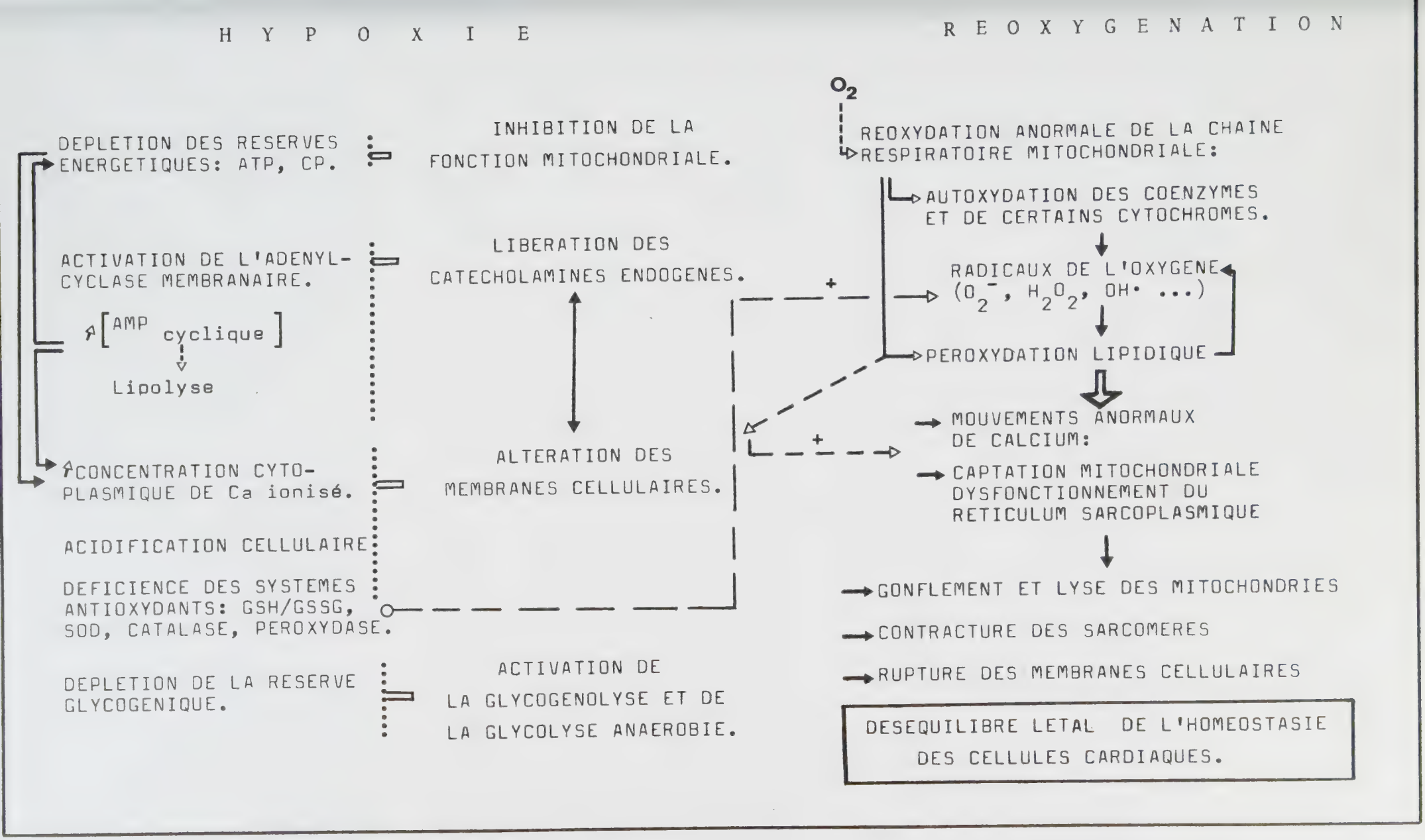


FIGURE 58

Evènements cellulaires et moléculaires impliqués dans la cytotoxicité de l'oxygène .

V-F. PERSPECTIVES D'AVENIR

Au délà de leur importance dans la compréhension des phénomènes physiopathologiques associés à une réoxygénation ou une perfusion, ces faits expérimentaux permettent de soulever de nombreuses questions quant aux processus d'oxydo-réduction qui favoriserait une utilisation normale ou anormale de l'oxygène par les cellules, tant en cardiologie qu'en cancérologie. Le métabolisme cellulaire de l'oxygène fait intervenir de nombreux composants de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces composants sont autant d'éléments susceptibles d'induire des déviations dans la réduction tétravalente de l'oxygène moléculaire.

Comment ces composants peuvent-ils catalyser une réduction anormale de l'oxygène ? A quels niveaux de la chaîne, les déviations de la voie tétravalente en voie univalente sont-elles toxiques pour la cellule ? Ces questions ne peuvent trouver des réponses définitives que dans des résultats d'expérimentation qui permettent :

i) d'identifier directement, et de manière sélective, les formes anormales de l'oxygène (singulet, ion superoxyde, radical hydroxyle) qui peuvent avoir des durées de vie ultra brèves (10^{-9} à 10^{-12} seconde),

ii) d'explorer les cinétiques de transfert de charge (H^+ ou e^-) entre les différents systèmes d'oxydo-réduction (coenzymes-cytochromes).

C'est pour tenter d'apporter des éléments de réponses à toutes ces questions fondamentales des processus d'oxydo-réduction en biologie, que nous avons entrepris, en collaboration avec le Laboratoire d'Optique Appliquée, Ecole Polytechnique, des recherches sur les transferts d'électrons dans les milieux biologiques.

Ces recherches nécessitent l'utilisation de techniques nouvelles et spécialement la spectroscopie laser résolue dans le temps. Avec ces techniques, nous étudions, à l'échelle de la subpicoseconde (10^{-13} s), les premiers évènements moléculaires et électroniques qui engendrent l'apparition d'espèces actives de l'oxygène au niveau de protéines hémiques : cytochrome P450, cytochrome C, cytochrome oxydase aa_3.

BIBLIOGRAPHIE

- AEBI, H. (1974)
In "Methodes of enzymatic analysis". BERGMEYER, H.U. Ed., NY. 1, 673.

- ALLEN, R. (1979)
Photochem. Photobiol. 30, 157.

- ALTSCHULD, R.A. et BRIERLEY, G.P. (1977)
J. Mol. Cell. Cardiol. 9, 875.

- ALTSCHULD, R.A, HOSTETLER, J.R. et BRIERLEY, G.P. (1981)
Cir. Res. 49, 307.

- ANTONINI, E., BRUNDRI, M., GREENWOOD, C. et MALMSTROM, B.G. (1970)
Nature 228, 936.

- ARCHIE, J.P. (1978)
J. Surg. Res. 25, 200.

- ATKINSON, D.E. (1968)
Biochematry 7,4030.

- AUST, S.D et SVINGEN, B.A. (1982)
In "Free Radicals in Biology", PRYOR, W.A. Ed,Acad. Press., NY.5,1

- BABIOR, B.M. (1978)
N. ENGP. J. Med. 14, 298.

- BAKKER, J.C., GORTMAKER, G.C., VROLIJK, A.C.M. et OFFRERINJS, F.G.J. (1976) - Pfl. Arch. 362, 21.

- BASSINGTHWAIGHTE, J.B. (1974)
Cir. Res. 35, 483

- BEAN, J.W. (1945)
Physiol. Rev. 25, 1.

- BEAN, J.W. (1964)
In "Oxygene in the Animal Organism". F. DICKENS et NEIL, E. Ed. NY, 455.

- BEAN, J.W. et SMITH, C.W. (1953)
Am. J. Physiol. 172, 169.

- BEAUCHAMP, C. et FRIDOVICH, I. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 4641.

- BECHER-FREYSENG, H. et CLAMAN, H.G. (1950)
In "German Aviation Medicine in World War II" 1, 493.

- BEGUE, J.M. (1979)
Thèse doctorat 3ème cycle - ORSAY

- BEHNKE, A.R. (1941-1942)
Harvey Lectures. Ser. XXXVII, 198.

- BENON, H., BIELSKI, J. et GEBICKI, J.M. (1977)
In "Free Radicals in Biology", W. PRYOR. Ed. Acad. Press. NY 3, 1.

- BERGMANN, S.R., CLARK, R.E. et SOBEL, B.E. (1979)
Am. J. Physiol. 236, H 4644.

- BERGMEYER, H.U. et BERNT, E. (1974)
In "Methods of Enzymatic Analysis" BERGMEYER, Ed. NY 3, 1577.

- BERKNER, L.V. et MARSHALL, L.C. (1964)
Discussions Faraday Soc. 37, 122.

- BERNE, R.M. (1963)
Amer. J. Physiol. 204, 317.

- BERNE, R.M. (1964)
Physiol. Rev. 44, 1.

- BERNE, R.M. BLACKMON, J.R. et GARNER, T.H. (1957)
J. Clin. Invest. 36, 1101.

- BERNHEIM, F. BERNHEIM, M.L.C. et WILBUR, K.M. (1948)
J. Biol. Chem. 174, 257.

- BERNT, E., BERGMEYER, H.U. et MOLLERING, H. (1974)
In "Methods of Enzymatic Analysis", BERGMEYER Ed. NY, 3, 1704.

- BERT, P. (1878)
Barometric Pressures Researchin Experimental Physiology.
College Book.

- BING, R.J., SIEGEL, A., UNGAR, I., GILBERT, M. (1954)
Am. J. Med. 16, 504.

- BING, A.H.L., BROOKS, W.W. et MESSER, J.V. (1976)
J. Mol. Cell. Cardiol, 8, 205.

- BORS, W., MICHEL, C., SARAN, M. et LENGFELDER, E. (1978)
Biochim. Biophys. Acta. 540, 162.

- BOVERIS, A. (1975)
Eur. J. Biochem. 57, 67.

- BOVERIS, A. (1977)
Adv. Exp. Med. Biol. 78, 67.

- BOVERIS, A. et CHANCE, B. (1973)
Biochem. J. 134, 707.

- BOVERIS, A., DOCAMPO, R., TURRENS, J.F. et STOPPANI, A.O.M. (1978)
Biochem.J., 175, 431.

- BRAASCH, W., GUDBJARNASON, S., PURI, P.S., RAVENS, K.G.
et BING, R.J. (1968)
Cir. Res. 23, 429.

- BRALET, J., BELEY, A., BRALET, A.M. et WEPIERRE, J. (1971)
Pflügers Arch. 323, 297.

- BRAUNWALD, E. (1971)
Am. J. Cardiol. 27, 416.

- BRAUNWALD, E., ROSS, J. et SONNENBLICK, E.H. (1976)
In "Mechanisms of Contraction of the Normal and Failing Heart,
Little, Brown and Company, Boston.

- BRITTON, L., MALINOWSKI, D.P. et FRIDOVICH, I. (1978)
J. Bacteriol. 134, 229.

- BUCKBERG, G.D. (1979)
J. Thorac. Cardiovas. Surg. 77, 803.

- BUEDING, E. et MANSOUR, J.M. (1957)
Brit. J. Pharmacol. 12, 159.

- BUNGER, R., HADDY, F.J., QUERENGASSER, A. et GERLACH, E (1975)
Pfl. Arch. 353, 317.

- BUNGER, R., SOMMER, O., WALTER, G. STIEGLER, H. et GERLACH, E.(1979)
Pfl. Arch. 380, 259.

- BUSUTTIL, R.W., PADDOCK, R.J., FISHER, J.W. et GEORGE, W.J.(1976)
Cir. Res. 38, 162.

- CADENAS, E., BOVERIS, A. et CHANCE, B (1980)
Biochem. J. 188, 577.

- CADENAS, E., VARSAVSKI, A.I., BOVERIS, A. et CHANCE, B. (1981)
Biochem. J. 198, 645.

- CAIN, D.F. et DAVIES, R.E. (1962)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 361.

- CAIN, D.F., INFANTE, A.A. et DAVIES R.E. (1962)
Nature, 196, 214.

- CALDARERA, M.C, DAVALLI, P. et GUARNIERI, C. (1978)
J. Molec. Cell. Cardiol. 10 Suppl. I, 16.

- CARLSTEN, A., HALLGREN, B., JAGENBURG, R., SVANBORG, A. et NERKO, L. (1961)
Scan. J. Clin. Lab. Invest. 13, 418.

- CARRIER, O., WALKER, J. et GUYTON, A.C. (1964)
Am. J. Physiol. 206, 951.

- CASE, R.B., BERGLAND, E. et SARNOFF, B.J. (1965)
Am. J. Med. 18, 397.

- CASE, R.B., FELIX, A., WACHTER, M., KRYAKIDIS, G. et CALTELLANA, F. (1978)
Cir. Res. 42, 410.

- CHALLONER, D.R. et STEINBERG, D. (1966)
Am. J. Physiol. 210, 280.

- CHANCE, B. (1965)
J. Gen. Physiol. 49, 163.

- CHANCE, B. et BOVERIS, A. (1978)
In "Extrapulmonary Manifestaton of Respiraton Disease" (ROBIN, E.D, Ed), DEKKA, NY, 185.

- CHANCE, B., SIES, H. et BOVERIS, A. (1979)
Physiol. Rev. 59, 527.

- CHANCE, B. et WILLIAMS, G.R. (1955)
J. Biol. Chem. 217, 385.

- CHEUNG, W.Y. et WILLIAMSON, J.R. (1965)
Nature, 207, 979.

- CHIEN, S. (1972)
Hemodilution Theoretical Basis and Clinical Application - KARGER. 1.45.

- CLARK, L.C. (1956)
Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs. 2, 41.

- CLARK, J.M. (1974)
Am. Rev. Resp. Disease 110, 40.

- CLARK, J.M. et LAMBERTSEN, C.J. (1971)
Pharmacol. Rev. 23, 38.

- COBURN, R.F., PLOEGMAKERS, F., GONDRIE, P. et ABBOUD, R. (1973)
Am. J. Physiol. 224, 870.

- COHEN, G. et HEIKKILA, R. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 2447.

- COOK, W.H.,LIPKIN, D. et MARKHAM, R. (1957)
J. Amer. Chem. Soc. 79, 3607.

- CORNBLATH, M., RANDLE, P.J., PARMEGGIANI, A. et MORGAN, H.E.(1963)
J. Biol. Chem. 238, 1592.

- CZAPSKI, G. (1971)
Ann.Rev. Phys. Chem. 171, 208.

- CZAPSKI, G. et ILAN, Y.A. (1978)
Photochem. Photobiol. 28, 651.

- CZOK, R. et LAMPRECHT, W. (1974)
In "Methods of Enzymatic Analyses", BERGMEYER Ed. NY, 2, 1446

- DANIELL, H.B. (1973)
Am. J. Physiol. 225, 1020.

- DAWES, G.S. (1941)
J. Physiol. (London) 99, 224.

- DECKER, K. (1974)
In "Methods of Enzymatic Analysis", BERGMEYER Ed., 3, 1988

- DEFARES, J.G. et VISSER, B.F. (1962)
Ann. N.Y Acad. Sci. 96, 939.

- DEL MAESTRO, R.F. (1979)
Diss. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.

- DEL MAESTRO, R.F. (1980)
Acta. Physiol. Scand. Suppl. 492, 153.

- DEMOPOULOS, H.B., MILVY, P., KAKARIS et RANSOHOFF, J. (1972)
In "Steroids and brain edema", Reulen, H.J. et SCHURMANN, K., Ed,
Springer - Verlag. NY. 29.

- DE DUVE, L. (1978)
In "Tocopherol oxygen and biomembranes" DE DUVE L. et O. HAYAISHI
Ed., Holland Biomedical Press. Amsterdam.

- DETAR, R. et BOHR, D.F. (1968)
Am. J. Physiol. 214, 241.

- DHALLA, N.S., BRAGAT, B.D., SULAKHE, P.V. et OLSON, R.E. (1971)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 177, 96.

- DICKENS, F. (1946)
Biochem. J. 40, 145.

- DOBSON, J.G. et MAYER, S.E. (1973)
Cir. Res. 33, 412.

- DOBSON, J.G., RUBIO, R. et BERNE, R.M. (1971)
Cir. Res. 29, 375.

- DOLE, M. (1965)
J. Gen. Physiol. 49, 5.

- DORFMAN, L.M. et ADAMS, G.E. (1973)
Reactivity of $OH^{\cdot}$ in aqueous solution. N° 46. National Bureau of standards.

- DOWELL, R.T., CUTILETTA, A.F. et SODT, P.C. (1975)
J. Appl. Physiol. 39, 1043.

- DRISCOL, T.E., MOIR, T.W. et ECKSTEIN, R.W. (1964)
Cir. Res. Suppl. I, p. 94.

- DULING, B.R. et BERNE, R.M. (1970)
Cir. Res. 27, 669.

- DUSTING, G.J. MONCADA, S.et VANE, J.R. (1979)
Progr. Cardiovasc. Dis. 21, 405.

- DUVELLEROY, M., BUCKLES, R.G., ROSENKAIMER, S.W., TUNG, C. et LAVER, M.B. (1970)
J. Appl. Physiol. 28, 227.

- DUVELLEROY, M., DURUBLE, M., MARTIN, J.L. et al. (1976)
J. Appl. Physiol. 41, 4.

- DUVELLEROY, M., DURUBLE, M., MARTIN, J.L., GAUDUEL, Y. et TEISSEIRE, B. (1979)
In "Hemorheology and diseases", Stoltz et Drouin Ed. 615.

- DUVELLEROY, M., MARTIN, J.L., TEISSEIRE, B., DURUBLE, M. et LAVER, M.B. (1981)
Bull. Eur. Physiopath. Resp. 17, 364.

- DUVELLEROY, M., MARTIN, J.L., TEISSEIRE, B., GAUDUEL, Y. et DURUBLE, M. (1980)
Biblio. Haemato, 46, 70.

- DUVELLEROY, M., MEHMEL, H. et LAVER, M.B. (1973)
J. Appl. Physiol. 35, 480.

- ECKENHOFF, J.E.,HAFKENSCHIEL, J.H., LANDMESSER, C.M. et HARMEL, M. (1947)
Am. J. Physiol. 149, 634.

- ENTMAN, M.L., LEVEY, G.S. et EPSTEIN, S.E. (1969)
Cir.Res. 25, 429.

- ERNSTER, L.,LIND, C., NORDENBRAND, K. et al. (1982)
In "Oxygenases and oxygen metabolism" Nozaki et al Ed., Acad. P. N.Y.,357.

- EVANS, C.L. et MATSUOKA, G. (1914)
J. Physiol. (London) 49, 378.

- FEUVRAY, D. et de LEIRIS, J. (1975)
J. Mol. Cell. Cardiol. 7, 307.

- FISHER, A.B. et DODIA, C. (1981)
Am. J. Physiol. 241, E. 47.

- FIECKEINSTEIN, A. (1971)
In "Calcium and the Heart", HARRIS P. et OPIE L.H., Ed. 157.

- FLOHE, L. (1982)
In "Free radicals in biology", PRYOR W.A. Ed. Acad. Press, NY 5, 223.

- FONG, K.L., Mc CAY, P.B., POYER, J.L., KEELE, B.B. et MISRA, H.(1973)
J. Biol. Chem. 248, 7792.

- FONT, et GAUTHERON, D. (1980)
B.B.A. 611, 299.

- FORMAN, H.J. et BOVERIS, A. (1982)
In " Free radicals in biology" W.A. PRYOR. Ed. Acad. Press. 5, 65.

- FREMINET, A. et LECLERC, L. (1980)
Comp. Biochem. Physiol. 65, 363.

- FRIDOVICH, I. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 4053.

- FRIDOVICH, I. (1975)
Ann. Rev. Biochem. 44, 147.

- FRIDOVICH, I. (1976)
Adv. Exp. Med. Biol. 74, 530.

- FRIDOVICH, I. (1978 a)
Science 201, 875.

- FRIDOVICH, I. (1978 b)
Photochem. Photobiol. 28, 733.

- GAMBLE, W.J. CONN, P.A, EDALJI KUMAR, A., PLENGE, R. et MONROE, R.G. (1970)
Am. J. Physiol. 219, 604.

- GANOTE, C.E., ANGELO, J., SAFAVI, S. et KALTENBACH, J.P. (1982)
J. Mol. Cell. Cardiol. 14, 587.

- GANOTE, C.E. Mc. GARR, J., LIU, S.T. et KALTENBACH, J.P. (1980)
J. Molec. Cell. Cardiol. 12, 387.

- GANOTE, C.E. et KALTENBACH, J.P. (1979)
J. Molec. Cell. Cardiol. 11, 389.

- GANOTE, C.E., SEABRA-GOMES, R., NAYLER, W.G. et JENNINGS, R.B.(1975)
Am. J. Pathol. 80, 419.

- GANOTE, C.E., WORSTELL, J. et KALTENBACH, J.P. (1976)
Am. J. Pathol. 84, 327.

- GAUDUEL, Y. (1978)
Thèse doctorat 3ème cycle, ORSAY, 183 p.

- GAUDUEL, Y. (1982)
Conv. Med. 1, 2.

- GAUDUEL, Y. et DUVELLEROY, M. (1983 a)
Ad. Exp. Med. Biol. Sous presse.

- GAUDUEL, Y. et DUVELLEROY, M. (1983 b)
Ad. Exp. Med. Biol. Sous presse.

- GAUDUEL, Y., KARAGUEUZIAN, H.S. et de LEIRIS, J. (1979)
J. Molec. Cell. Cardiol. 11, 717.

- GAUDUEL, Y., MARTIN, J.L., TEISSEIRE, B., DURUBLE, M. et DUVELLEROY, M. (1980)
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, Suppl. I, P. 48.

- GAUDUEL, Y., MARTIN, J.L., TEISSEIRE, B., DURUBLE, M. et DUVELLEROY, M. (1982)
Biochem. Med. 28, 324.

- GAUDUEL, Y. et DUVELLEROY, M. (1983 c)
J. Molec. Cell. Cardiol. Sous presse.

- GAWEHN, K. (1974)
In "Methods of Enzymatic Analysis", BERGMEYER, Ed. N.Y 4, 2234.

- GAZITUA, S., SCOTT, J.B., SWINDALL, B. et HADDY, F.J. (1971)
Am. J. Physiol. 220, 384.

- GIESEN, J. et KAMMERMEIER, H.J. (1980)
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 891.

- GILBERT, D.L. (1964)
In "Oxygen in the animal organism", DICKENS et NEIL. Ed. 641.

- GILBERT, D.L. (1963)
Radiation Res. Suppl. 3, 44.

- GOLDSTEIN, I.M. et WEISSMANN, G. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 604.

- GOOD, C., KRAMER, H. et SOMOGYI, M. (1933)
J. Biol. Chem. 100, 485.

- GORNALL, A.G. BARDAWILL, C.J. et DAVID, M.M. (1949)
J. Biol. Chem. 177, 751.

- GOTTLIEB, S.F. (1965)
Advan. Clin. Chem. 8, 69.

- GRAY, L.H. CONGER, A.D., EBERT, M., HERNSEY, S. et SCOTT, O.C.A. (1953)
Brit. J. Radiol. 26, 638.

- GRAY, L.H. et SCOTT, O.C.A. (1964)
In "Oxygen in the Animal Organism", F. DICKENS et E. NEIL, Ed. NY .

- GREENWALD, R.A. et MOY, W.N. (1979)
Arthritis Rheum. 22, 251.

- GUARNIERI, C., FERRARI, R., VISIOLI, O., CALDARERA, C.M. et NAYLER, W.G. (1978)
J. Molec. Cell. Cardiol. 10, 893.

- GUARNIERI, C., FLAMIGNI, F. et CALDARERA, C.M. (1980)
J. Molec. Cell. Cardiol. 12, 797.

- GUDBJARNASON, S., MATHES, P. et RAVENS, K.G. (1970)
J. Mol. Cell. Cardiol. 1, 325.

- GUTMANN, I. et WAHLEFELD, A.M. (1974)
In "Methods of Enzymatic Analysis", BERGMEYER. Ed. NY, 2, 1510.

- GUYTON, A.C., ROSS, J.M., CARRIER, O. et WALKER, J.R. (1964)
Cir. Res. Suppl. I, P. 60.

- HABER, F. et WEISS, J. (1934)
Proc. Roy. Soc. A. 147, 332.

- HALDANE, J.B.S. (1941)
Nature 148, 458.

- HALLIWELL, B. (1977)
In "Superoxyde and superoxyde dismutases", MICHELSON A.M. et FRIDOVICH, I.
Acad. Press. London. 335.

- HALLIWELL, B. (1978)
Cell. Biology. International. Reports, 2, 113.

- HARRIS, E.J., BOOTH, R. et COOPER, M.B. (1982)
Febs letters 146, 267.

- HARRISON, T.R., FRIEDMAN, B. et RESNIK, H. (1936)
Arch. Internal. Med. 57, 927.

- HASSINEN, I.E., et HILTUNEN (1975)
Biochem. Biophys. Acta 408, 319.

- HATT, P.Y., MORAVEC, J., SEROUSSIS, S. et SWYNGHEDAW, B. (1969)
Press. Med. 77, 1557.

- HAUGAARD, N. (1946)
J. Biol. Chem. 164, 265.

- HAUGAARD, N. (1965)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 117, 736.

- HAUGAARD, N. (1968)
Physiol. Rev. 48, 312.

- HAWCO, F.J., O'BRIEN, C.R. et O'BRIEN, P.J. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 354.

- HEARSE, D.J. (1977 a)
J. Mol. Cell. Cardiol. 9, 605.

- HEARSE, D.J. (1977 b)
J. Mol. Med. 2, 185.

- HEARSE, D.J. (1977)
J. Molec. Cell. Cardiol. 9, 605.

- HEARSE, D.J. et CHAIN, E.B. (1972)
Biochem. J. 128, 1125.

- HEARSE, D.J., GARLICK, P.B. et HUMPHREY, S.M. (1977 c)
Am. J. Cardiol. 39, 986.

- HEARSE, D.J. et HUMPHREY, S.M. (1975 a)
J. Mol. Cell. Cardiol. 7, 463.

- HEARSE, D.J., HUMPHREY, S.M. et BULLOCK, G.R. (1978)
J. Mol. Cell. Cardiol. 10, 641.

- HEARSE, D.J., HUMPHREY, S.M. et CHAIN, E.B. (1973)
J. Mol. Cell. Cardiol. 5, 395.

- HEARSE, D.J.,HUMPHREY, S.M., FEUVRAY, D. et de LEIRIS, J.(1976)
J. Molec. Cell. Cardiol. 8, 759.

- HEARSE, D.J., HUMPHREY, S.M., NAYLER, W.G., SLADE, A. et BORDU, D. (1975 b)
J. Mol. Cell. Cardiol. 7, 315.

- HEARSE, D.J., STEWART, D.A. et BRAIMBRIDGE, M.V. (1975 c)
GR. Res. 36, 481.

- HEARSE, D.J., STEWART, D.A. et BRAIMBRIDGE, M.V. (1980)
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 79, 39.

- HEMINGWAY, A. et FEE, A.R. (1927)
J. Physiol. (London) 63, 299.

- HEMINGWAY, A. et WILLIAMS, W.L. (1952)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 80, 331.

- HENQUELL, L. (1980)
Thèse d'état de sciences, Besançon.

- HENQUELL, L. et HONIG, C.R. (1976)
Microvasc. Res. 12, 35.

- HESS, M.L., OKABE, E. et KONTOS, H.A. (1981)
J. Mol. Cell. Cardiol. 13, 767.

- HEYNDRICKX, G.R., BAIG, H., NELLENS, P., LEUSEN, I., FISHBEIN,M.C. et VATNER, S.F. (1978)
Am. J. Physiol. 234, H 653.

- HIGHMAN, B., ALTLAND, P.D. et GARBUS, J. (1965)
Arch. Path. 80, 332.

- HIGHMAN, B., MALING, H.M. et THOMPSON, E.C. (1959)
Am. J. Physiol. 196, 436.

- HILL, L. (1912)
Caisson sickness and the physiology of wark in compressed air.
London, Arnold.

- HOCHACHKA, P.W., NEELY, J.R. et DRIEDZIC, W.R. (1977)
Fed. Proc. 36, 2009.

- HOLLIAN, A., OWEN, C.S. et WILSON, D.F. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 181, 164.

- HONIG, L.R. et BOURDEAU-MARTINI (1973)
Ad. Exp. Med. Biol. 37, 55.

- HONIG, C.R. et BOURDEAU-MARTINI (1974)
Cir. Res. 34, Suppl. II, 97.

- HONIG, C.R., FELDSTEIN, M.L. et FRIERSON, J.L. (1977)
Am. J. Physiol. 233, H 122.

- JACOBSON, J.A., MORSCH, J.H.C. et RENDELL-BAKER, L. (1965)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 117, 651.

- JACOBUS, W.E., MOREADITH, R.W. et VANOEGAER, K.M. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 2397.

- JAWORECK, D., GRUBER, W. et BERGMEYER, H.U. (1974)
In "Methods of Enzymatic Analysis", BERGMEYER. Ed. N.Y. 3, 2127.

- JEFFERSON, L.S., WOLPERT, E.B., GIGER, K.E. et MORGAN, H.E. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 2171.

- JOCELYN, P.C. (1972)
"Biochemister of the SH Group". Acad. Press. N.Y.

- JONES, D.P., EKLOW, L., THOR, H. et ORRENIUS, S. (1981)
Arch. Biochem. Biophys. 210, 505.

- JONES, R.D. et BERNE, R.M. (1964)
Cir. Res. 14, 126.

- JONES, R.D. et BERNE, R.M. (1965)
Cir. Res. 17, 540.

- KAO, R., RANNELS, D.E. et MORGAN, H.E. (1976)
Cir. Res. 38, I 124.

- KASCHNITZ, R.M. et HATEFI, Y. (1975)
Arch. Biochem. Biophys. 171, 292.

- KEARNS, D.R. (1971)
Chem. Rev. 71, 395.

- KELLOGG, E.W. et FRIDOVICH, I. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 8812.

- KELMAN, G.R. (1966)
J. Appl. Physiol. 21, 1375.

- KERBER, R.E. et ABBOUD, F.M. (1975)
Cir. Res. 36, 145.

- KOSOWER, NS. et KOSOWER, E.M. (1970)
Lancet 2, 1343.

- KEUL, J., KEPPLER, D. et DOLL, E. (1967)
Arch. Intern. Physiol. Biochem. 75, 573.

- KHAN, A.U. (1970)
Science 168, 476.

- KOHN, M.C., ACHS, M.J. et GARFINKEL, D. (1977)
Amer. J. Physiol. 234, 158.

- KOPIN, I.J. et GORDON, E.K. (1963)
Nature, 199, 1289.

- KOPPENOL, W.A., BUTLER, J. et VAN LEEUWEN, J.W. (1978)
Photochem. Photobiol. 28, 655.

- KOSOWER, N.S. et KOSOWER, E.M. (1976)
In "Free radicals in biology", W.A. PRYOR, Ed. Acad. Press. 2, 55.

- KOVALCIK, V. (1963)
J. Physiol. 169, 185.

- KREBS, E.G. et FISHER, E.H. (1955)
J. Biol. Chem. 216, 113.

- KRINSKY, N.I (1977)
FEBS, 35.

- KROGH, A. (1919)
J. Physiol. 52, 409.

- KUBLER, N. et SPIE CKERMAN, P.G. (1970)
J. Mol. Cell. Cardiol. 1, 351.

- LABORITH et BRUE, F. (1963)
Rev. Agressologie 4, 469.

- LAMBERSTSEN, C.J. (1965)
Trans. Studies Coll. Physicians Phila. 33, 1.

- LAMPRECHT, W. et STEIN, P. (1974)
In "Methods of Enzymatic Analysis", BERGMEYER Ed. N.Y.3, 1777.

- LAMPRECHT, W. et TRAUTSHOLD, I. (1974)
In "Methods of Enzymatic Analysis, BERGMEYER Ed. 2, 2001.

- LANG, G. et MICHAL, G. (1974)
In "Methods of Enzymatic Analysis", BERGMEYER Ed. N.Y. 2, 1238.

- LANGENDORFF, (1895)
Pfl. Arch. 61, 291.

- KOSOWER, N.S. et KOSOWER, E.M. (1974)
In " Symposium on glutathione", Flohe et al Ed., Thienne Stuttgart , 216.

- LA NOUE, K.F., BRYLA, J. et WILLIAMSON, J.R. (1962)
J. Biol. Chem. 247, 667

- LA NOUE, K.F. et SCHOOL WERTH, A.C. (1979)
Ann. Rev. Biochem. 48, 871

- LAURENT, D., BOLENE-WILLIAMS, C., WILLIAMS, F.L. et KATZ, L.N. (1956)
Am. J. Physiol. 185, 355

- LAWRENCE, R.A. et BURK, R.F. (1978)
J. Nutr. 108, 211

- LECLERC, L., PIERRE, M., POULLET, A., HUEL, C. et FREMINET, A. (1978)
J. Physiol. (Paris) 74, 35

- LEFER, A.M., ARAKI, H. et OKAMATSU, S. (1981)
Cir. Shock 8, 273

- LEHNINGER, A.L. (1974)
In "Bioenergetics", Benjamin, Ed. California. 89 P.

- de LEIRIS, J., BEGUE, J.M., GAUDUEL, Y. et FEUVRAY, D. (1980)
J. Physiol. (Paris), 76, 813

- de LEIRIS, J., PEYROT, M. et FEUVRAY, D. (1978)
J. Mol. Med. 3, 111

- LITTLE, C. et O'BRIEN, P.J. (1968)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 145

- LOMBARDO, T.A., ROSE, L., TAESCHLER, M., TUBY, S. et BING, R.J.
(1953) - Circulation 7, 71

- LOSCHEN, G. et AZZI, A. (1976)
In "Recent Advances in Studies on Cardial Structure and Metabolism"
P. Harris et R. Bing. Ed. Baltimore, 3

- LOSCHEN, G., AZZI, A. et FLOCHE, L. (1973)
Febs Lett. 33, 84

- LOSCHEN, G., AZZI, A. et FLOCHE, L. (1974)
In "Alcohol and aldehyde metabolizing systems" Thurman et al.
Ed. Acad. Press, N.Y, 215

- LOWE, R.D. et THOMPSON, J.W. (1962)
J. Physiol. (London) 162, 62 p.

- MANSOUR, T.E. et MANSOUR, J.M. (1962)
J. Biol. Chem. 237, 629

- MANSOUR, T.E. (1963)
J. Biol. Chem. 238, 2285.

- MARTIN, J.L. (1979)
Thèse doctorat Ingérieur, ORSAY.

- MARTIN, J.L., DUVELLEROY, M., TEISSEIRE, B. et DURUBLE, M. (1979)
Pfl. Arch. 382, 57.

- MARTINI, J. et HONIG, C.R. (1969)
Microvasc. Res. 1, 244.

- MAYER, S.E., WILLIAMS, B.J. et SMITH, J.M. (1967)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 139, 686.

- Mc CORD, J.M., BOYLE, J.A., DAY, E.D., RIZZOLO, L.J. et SALIN, M.L. (1977)
In "Superoxyde and superoxide dismutases". MICHELSON, A.M. et al., E.D., Acad. Press. N.Y. 225.

- Mc CORD, J.M. et FRIDOVICH, I. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 6049.

- MEERSON, F.Z. et USTINOVA, E.E. (1982)
Kardiologiya 22, 89.

- MENASCHE, P., BERCOT, M. et PIWNICA, A. (1979)
Coeur, 10, 7.

- MENASCHE, P., BERCOT, M. et PIWNICA (1980)
International Symposium on cardioplegia, Londres.

- MESSMER, K., SUNDER. PLASSMANN, L., KLOVE KORN, N.P. et HOLPER, K. (1972)
Adv. microcir. 4, 1.

- MICHAL, G. et BEUTLER, H. (1974)
In "Methods of enzymatic Analysis", BERGMEYER, Ed. N.Y. 2, 1314.

- MICHELSON, A.M. (1977)
In "Biochemical and medical aspects of active oxygene". HAYAISHI, O. et ASADA, K. Ed. U. Park Press, Baltimore.

- MISRA, H.P. et FRIDOVICH, I. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 6868.

- MISRA, H.P. et FRIDOVICH, I. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3170.

- MORGAN, H.E. et PARMEGGIANI, P. (1964)
J. Biol. Chem. 239, 2440.

- MORGAN, H.E., RANDLE, P.J. et REGEN, D.(1959)
Biochem. 73, 573.

- MUDGE, G.H., MILLS, R.M., TREGTMEYER, H., GORLIN, R. et LESCH, M. (1976)
J. Clin. Invest. 58, 1185.

- MURAD, F. et VAUGHAN, M. (1969)
Biochem. Pharmacol. 18, 1053.

- NAMM, D.H. et MAYER, S.E. (1968)
Molec. Pharmacol. 4, 61.

- NARABAYASHI, H., TAKESHIGE, K. et MINAKAMI, S. (1982)
Biochem. J. 202, 97.

- NAYLER, W.G., et BERRY, D. (1975)
J. Mol. Cell. Cardiol. Vol. 7, P. 387

- NEELY, J.R., DENTON, R.M., ENGLAND, P.J. et RANDLE, P.J (1972 a)
Biochem. J. 128, 147.

- NEELY, J.R., LIEBERMEISTER, H., BATTERSBY, J. et MORGAN,H.E(1967 a)
Amer. J. Physiol. 212, 804.

- NEELY, J.R., LIEBER MEISTER, H. et MORGAN, H.T. (1967 b)
Am. J. Physiol. 212, 815.

- NEELY, J.R., ROVETTO, M.J. et ORAM, J.F. (1972 b)
Prog. Cardiovasc. Dis. 15, 289.

- NEELY, J.R., ROVETTO, M.J., WHITMER, J.T. et MORGAN, H.E.(1973)
Am. J. Physiol. 225, 651.

- NEELY, J.R., WHITFIELS, C.F. et MORGAN, H.E. (1970)
Am. J. Physiol. 319, 1082.

- NEJAD, N.S. et OGDEN, E. (1967)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 767.

- NISHIKI, K., ERECINSKA, M. et WILSON, D.F. (1978)
Am. J. Physiol. 234, 673.

- NOHL, H. et HEGNER, D. (1978)
Eur. J. Biochem. 82, 563.

- NOHL, H. et JORDAN, W. (1980)
Eur. J. Biochem. 111, 203.

- NOZAKI, M., YAMAMOTO, F. et al. (1982)
In "Oxygenase and oxygen metabolism" NOZAKI et al. Ed. Acad Press NY

- OHLSSON, W.T.L. (1947)
Acta. Med. Scand. Suppl. 190, 1.

- OLSSON, R.A. (1970)
Cir. Res. 26, 301.

- OLSSON, R.A. (1981)
Ann. Rev. Physiol. 43, 385.

- OLSSON, R.A., DAVIS, J.C., KHOURI, E.M. et PATTERSON, R.E. (1976)
Cir. Res. 39, 93.

- OPIE, L.H. (1965)
J. Physiol. (London) 180, 529.

- OPIE, L.H. (1968)
Am. J. Physiol. 76, 685; 77, 100.

- OPIE, L.H. (1971 a)
Cardiology 56, 2 .

- OPIE, L.H. (1976)
Cir. Res. 38, 52.

- OPIE, L.H., MANSFORD, R.L. et OWEN, P. (1971 b)
Biochem. J. 124, 675.

- OPITZ, E. et SCHNEIDER, M. (1950)
Ergebn. Physiol. 46, 126.

- OWEN, C.S. et WILSON, D.F. (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 161, 581.

- PARMEGGIANI, A. et MORGAN, H.E. (1962)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 9, 252.

- PARR, D.R., WIMHURST, J.M. et HARRIS, E.J. (1975)
Cardiovasc. Res. 9, 366.

- PELOSI, G., CONTI, F. et AGLIATI, G. (1969)
Eur. J. Pharmacol. 8, 19.

- OTTOLENGHI, A. (1959)
Arch. Biochem. Biophys. 79, 355.

- PETERSON, M.B. et LESCH, M. (1975)
J. Mol. Cell. Cardiol. 7, 175.

- PETKAU, A. (1980)
Acta Physiol. Scand. Suppl. 492, 81.

- PREWITT, R.L. et JOHNSON, P.C. (1976)
Microvasc. Res. 12, 59.

- PRYOR, W.A. (1966)
Free radicals, Mc Graw-Hill. N.Y.

- PRYOR, W.A. (1976-1982)
In "Free radicals in Biology" W.A. PRYOR Ed. Acad.Press. N.Y 1, 5

- PRYOR, W.A. (1978)
Photochem. Photobiol. 38, 787.

- RAAB, W., STARK, E., Mc MILLAN, N.H. et GIGEE, W.R. (1961)
Am. J. Cardiol. 8, 203.

- RAND, P.W., NELSON, C.V., LACOMBE, E.H., BARKER, N.D. et PIRONE, L.A. (1979)
Am. J. Physiol. 237, 4348.

- RANDLE, P.J. et SMITH, G.H. (1958)
Biochem. J. 70, 490.

- REGEN, D.M., DAVIS, W.W., MORGAN, H.E. et PARK, C.R. (1964)
J. Biol. Chem. 239, 43.

- REIBEL, D.K. et ROVETTO, M.J. (1979)
Am. J. Physiol. 234, H.620.

- RICH, P.R. et BONNER, W.D. (1978)
Arch. Biochem. Biophys. 188, 206.

- RISTER, M. et BAEHNER, R.L. (1976)
J. Clin. Invest. 58, 1174.

- ROBIN, E.D. (1980)
Bibl. Haematol. 46, 96.

- ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W., OYE, I., MORGAN, H. et SUTHERLAND, E.W. (1965)
Molec. Pharmacol. 1, 168.

- ROUBAL, W.T. et TAPPEL, A.L. (1966)
Arch. Biochem. Biophys. 113, 5 .

- ROVETTO, M.J., WHITMER, J.T. et NEELY, J.R. (1973)
Cir. Res. 32, 699.

- ROWE, G.G., AFONSO, S., LAGO, J.E., CASTILLO, C.A., BOAKE, W.C. et CRAMPTON, C.W. (1965)
Circulation 32, 251.

- RUBIO, R. et BERNE, R.M. (1969)
Cir. Res. 25, 407.

- RUSHMER, R.F. (1969)
Circulation, 34, 168.

- SAKS, V.A., CHERNOSOVA, G.B., VORONKOV, I.I., SMIRNOV, V.N. et CHAZOV, E.I. (1974)
Cir. Res. 34, et 35, Suppl. III, 138.

- SARNOFF, S.J., BRAUNWALD, E., WELCH, G.H., CASE, R.B., STAINBY, W.N. et MACRUZ, R. (1958)
Am. J. Physiol. 192, 148.

- SCARPA, A. et LINDSAY, J.G. (1972)
Eur. J. Biochem. 27, 401.

- SCHAPER, J., HEHRLEIN, F., SCHLEPPER, M. et THIEDEMANN (1977)
J. Mol. Cell. Cardiol. 9, 175.

- SCHENK, E.A., GALBREATH, R. et AOSS, A.J. (1966)
Cir. Res. 18, 618.

- SCHELLER, J. (1967)
Am. J. Cardiol. 19, 385.

- SCHMIDT, F.H. (1961)
Klin. Wschr. 39, 1244.

- SELMECI, L., POSCH, E. et SOS, J. (1968)
Life Sciences, 7, 951.

- SERAYDARIAN, M.W. et ARTAZA, L. (1976)
J. Molec. Cell. Cardiol. 8, 669.

- SHEA, T.M., WATSON, R.M., PISTROWSKI, S.F., DERMAKSIAN, G. et CASE, R.B. (1962)
Am. J. Physiol. 203, 463.

- SHELL, W.E., LAVELLE, J.F., COVELL, J.W. et SOBEL, B.E. (1973)
J. Clin. Inv. 52, 2579.

- SCHEELE, C.W. (1782°
Cem. ABH. Luft. Feuer. Vol. 2, p. 132

- SUSSMAN, I. et ERECINSKA, M. et WILSON, D.F. (1980)
Bioch. Biophys. Vol. 591, p. 209

- SHINDER, R., HARAKAL, C. et SEVY, R.W. (1968)
Proc.Soc. Exp. Biol. Med. 128, 798.

- SHLAFER, M., KANE, P.F. et KIRSH, M.M. (1982 a)
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 83, 370.

- SHLAFER, M., KANE, P.F., VALERIE, Y., WIGGINS, A.S. et KIRSH, M.M. (1982 b)
Circulation 66. Suppl. I, I.85.

- SHRAGO, E., SHUG, A.L., SUL, H., BITTAR, N. et FOLTZ, J.D. (1976)
Cir. Res. Suppl. I.38, I. 75.

- SHUG, A.L. et SHRAGO, E. (1973)
J. Lab. Clin. Med. 81, 214.

- SIEGEL, A.L. et COHEN, P.S. (1974)
In "Methods of enzymatic Analysis" BERGMEYER H.U. Ed. Acad.Press. N.Y. 2, 7.

- SINET, P.M. et GARBER, P. (1981)
Arch. Biochem. Biophys. 212, 411.

- SINNHUBER, R.O. et YU, T.C. (1958)
Food. Technology, 12, 9.

- SLUIJTER, M.E. (1963)
Proc. Roy. Soc. Med. 56, 1002.

- SMITH, G. et SHARP, G.R. (1960)
Lancet 2, 905.

- SOBEL, B.E., BRESNAHAN, G.F., SHELL, W.E. et YODER, R.D. (1972)
Circulation 46, 641.

- SONNENBLICK, E.H., ROSS, J., COWELL, J.W., KAISER, A. et BRAUNWALD, E. (1965)
Am. J. Physiol. 209, 919.

- SORDAHL, L.A. et SCHWARTZ, A. (1967)
Molec. Pharmacol. 3, 509.

- SPARKS, H.V., ET BELLONI, F.L. (1978)
Ann. Rev. Physiol. 40, 67.

- SPIKES, J.D. et SWARTZ, H.M. (1978)
Photochem. Photobiol. 28, 92.

- SKINNER, N.S. et COSTIN, J.C (1971)
Cir. Res. Vol. 29, Suppl. 1, p. 73

- STADIE, W.C. et HAUGAARD, N. (1945)
J. Biol. Chem. 161, 153.

- STADIE, W.C., RIGGS, B.C. et HAUGAARD, N. (1944)
Am. J. Med. Sci. 207, 84.

- STEWART, J.R.; BLACKWELL, W.H. et al. (1983)
J. Thorac Cardiovasc. Surg. Vol. 86, p. 262

- STJARNE, L. (1966)
Pharmacol. Rev. 18, 425.

- SUGIOKA, K. et NAKANO, M. (1976)
Bioch. Biophys. Acta 423, 203.

- SUTHERLAND, E.W. (1951)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 54, 693.

- SUTHERLAND, E.W. et RALL, T.W. (1957)
J. Amer. Chem.Soc. 79, 3608.

- SUSSMAN, I., ERECINSKA, M. et WILSON, D.F. (1980)
Bioch. Biophys. Acta 591, 209.

- SVINGEN, B.A., O'NEAL, .FO. et AUST, S.D. (1978)
Photochem. Photobiol. 28, 803.

- SWYNGHEDAUW, B. et HATT, P.Y. (1972)
Arch. Mal.Coeur et Vaiss. 7, 777.

- TADA, M., KIRCHBERGER, M.A. et KATZ, A.M. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 2640.

- TAEGTMEYER, H., HENCO, R. et KREBS, H.A. (1980)
Biochem. J. 186, 701.

- TAEGTMEYER, H., PETERSON, M.B., RAGAVAN, V.V., FERGUSON, A.G. et LESCH, M. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 5010.

- TAKALA, T., HILTUNEN, J.K. et HASSINEN, I.E. (1980)
Biochem. J. 192, 285-295.

- TAKAYANAGI, R., TAKESHIGE, K et MINAKAMI, S. (1980)
Biochem. J. 192, 861 .

- TAKESHIGE, K., TAKAYANAGI, R. et MINAKAMI, S. (1980)
Biochem. J. 192, 861.

- TIETZE,F. (1969)
Biochemistry. Vol. 27, P. 502

- TAPPEL, A.L. et ZALKIN, H. (1959 a)
Arch. Biochem. Biophys. 80, 326.

- TAPPEL, A.L. et ZALKIN, H. (1959 b)
Arch. Biochem. Biophys. 80, 333.

- TAUBE, H. (1965)
J. Gen. Physiol. 49, 29.

- THOMAS, M.J., MEHL, K.S. et PRYOR, W.A. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 927.

- TIETZE, F. (1969)
Analyticol Biochem. 27, 502.

- TRENOUTH, R.S., PHELPS, N.C. et NEILL, W.A. (1976)
Cir. 53, 644.

- TURRENS, J.F. et BOVERIS, A. (1980)
Biochem. J. 191, 421.

- VARY, T.C., REIBEL, D.K. et NEELY, J.R. (1981)
Ann. Rev. Physiol. 43, 419.

- VIAL, C., FONT, B., GOLDSCHMIDT, D., PEARLMAN, A.S. et DELAYE, J. (1978)
Cardiovasc. Res. 12, 470.

- VIZEK, M. et ALBRECHT, I. (1973)
Physiol. Bohemoslov. 22, 573.

- VON KORFF, R.W. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 1351.

- WAREMBOURG, H., BISERTE, G., BERTRAND, M., SEZILLE, G. et JAILLARD, J. (1969)
Pathol. Biol. 17, 559.

- WATANABE, A.M. et BESCH, H.R. (1974)
Cir. Res. 35, 316.

- WEBER, K.T. et JANICKI, J.S. (1979)
Am. J. Cardiol. 44, 722.

- WEBER, K.T., JANICKI, J.S. et FISHMAN, A.P. (1980)
Am. J. Physiol. 238, 4118.

- WEGICKI, W.B., WHALEN, R.E., THOMPSON, H.K. et Mc INTOSH, H.D. (1966)
Natl. Res. Council. Publ. 1404, 258.

- WEISIGER, R.A. et FRIDOVICH, I. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 3582.

- WHALEN, W.J., SAVOCA, J. et NAIR, P. (1973)
Am. J. Physiol. 225, 986.

- WHITMER, J.F., IDELL-WENGER, J.A., ROVETTO, M.J. et NEELY, J.R. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 4305.

- WILLIAMSON, J.R. (1966)
J. Biol. Chem. 241, 5026.

- WILLIAMSON, J.R. (1979)
Ann. Rev. Physiol. 41, 485.

- WILLIAMSON, J.R., FORD, C., ILLINGNORTH, J. et SAFER, B. (1976)
Cir. Res. Suppl. I, 38, 39.

- WILLIAMSON, J.R., SCHAFFER, S.W., FORD, C. et SAFER, B. (1976)
Circulation 53, Suppl. I, 3.

- WILSON, D.F., ERECINSKA, M., DROWN, C. et SILVER, I.A. (1979 a)
Arch. Biochem. Biophys. 195, 485.

- WILSON, D.F., ERECINSKA, M., NUUTINEN, E. et SILVER, I.A. (1983)
Isott Meeting, Ruston, USA.

- WILSON, D.G., OWEN, C.S. et ERECINSKA, M. (1979 b)
Arch. Biochem. Biophys. 195, 494.

- WILSON, D.F., OWEN, C.S. et HOLIAN, A. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 182, 749.

- WILSON, D.F., STUBBS, M., OSHINO, N. et ERECINSKA, M. (1974)
Biochemistry, 13, 5305.

- WITTENBERG, J.B. (1970)
Physiol. Rev. 50, 559.

- WOLLENBERGER, A., RISTAU, O. et SCHOFFA, G. (1960)
Pfl. Arch. 270, 399.

- WOLLENGERGER, A. et SHAHAB, L. (1965)
Nature 207, 88.

- WROBLEWSKI, F. et LA DUE, J.S. (1955)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90, 210.

- YEO, G.F. (1885)
J. Physiol. 6, 93·

- YIPINTSOI, T., PENPARGKUL, S., RITZER, T. et SCHEUER, J. (1979)
Amer. J. Physiol. 237, 4696.

- ZIMMERMANN, R., FLOHE, L., WESER, U. et HARTMANN,HJ. (1973)
FEBS Letters 29, 117.

ANNEXE

Les résultats inclus dans cette thèse ont fait l'objet des publications suivantes:

1 de LEIRIS, J., GAUDUEL, Y. et FEUVRAY, D. (1977)
Role of myocardial catecholamines in the development of the anoxic cell damage.
Proc. Int. Union Physiol. Sci. 13, 175.

2 GAUDUEL, Y., KARAGUEUZIAN, H.S. et de LEIRIS, J. (1979)
Deleterious effects of endogenous catecholamines on hypoxic myocardial cells following reoxygenation.
J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 717-731.

3 GAUDUEL, Y., MARTIN, J.L., TEISSEIRE, B., DURUBLE, M. et DUVELLEROY, M.(1979)
Performance of an isolated rat heart perfused with blood and red cell free electrolyte solution.
J. Mol. Cell. Cardiol. 11, Suppl. 2, 15

4 DUVELLEROY, M., MARTIN, J.L., TEISSEIRE, B., GAUDUEL, Y. et DURUBLE, M.(1980)
Abnormal hemoglobin oxygen affinity and the coronary circulation.
Surg. Hemotherapy 46, 70-77.

5 GAUDUEL, Y., MARTIN, J.L., TEISSEIRE, B., DURUBLE, M. et DUVELLEROY, M.(1980)
Hemodynamic performance of an isolated rabbit heart at rest and during increased afterload.
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, Suppl. 1, 48.

6 de LEIRIS, J., BEGUE, J.M., GAUDUEL, Y. et FEUVRAY, D. (1980)
Lésions cellulaires précoces induites par l'hypoxie myocardique; rôle éventuel de l'AMPcyclique.
J. Physiol. 76, 813-819.

7 DUVELLEROY, M., DURUBLE, M., MARTIN, J.L., GAUDUEL, . et TEISSEIRE, B.(1981)
Oxygen and hemodilution. In "Hemorheology and diseases"
J.F. Stoltz et P. Drouin Ed., 615-619.

8 GAUDUEL, Y. (1982)
Oxygène et métabolisme énergétique cardiaque.
Conv. Med. 1, 91-98.

9 GAUDUEL, Y., MARTIN, J.L., TEISSEIRE, B., DURUBLE, M. et DUVELLEROY, M.(1982)
The dependence of cardiac energy metabolism on oxygen carrying capacity.
Biochem. Med. 281, 324-340.

10 GAUDUEL, Y. et DUVELLEROY, M. (1983)
Deleterious effects of oxygen radicals on reoxygenated myocardial cells.
Adv. Exp. Med. Biol. , sous presse.

11 GAUDUEL, Y. et DUVELLEROY, M. (1983)
Direct effects of oxygen toxicity during the cardiac "oxygen paradox"
Adv. Exp. Med. Biol., sous presse.

12 GAUDUEL, Y. et DUVELLEROY, M. (1983)
Role of oxygen radicals in cardiac injury due to reoxygenation.
J. Mol. Cell. Cardiol. Accépté pour publication.

Biblthca haemat., No. 46, pp. 70–77 (Karger, Basel 1980)

Abnormal Hemoglobin Oxygen Affinity and the Coronary Circulation[1]

M.A. Duvelleroy, J.L. Martin, B. Teisseire, Y. Gauduel and M. Duruble

Laboratoire de Biophysique, Hôpital Fernand Widal, Université Paris VII, Paris

Introduction

The physiological significance of an acute change in O_2 affinity is not completely clear, although several investigators have made an effort to clarify this problem [*Bakker et al.*, 1976; *Turek et al.*, 1973; *Yhap et al.*, 1975]. According to these reports a shift of the HbO_2 curve to the left should result either in a decrease in myocardial oxygen consumption ($M\dot{V}o_2$), or in an increase of coronary blood flow ($\dot{Q}$) to compensate for the decrease in P_{50}. The working isolated heart is a useful model for such studies, firstly because the arteriovenous oxygen difference across the coronary vascular bed is large, and, secondly, because transient myocardial ischemia is readily translated into altered muscle function.

A blood-perfused isolated rat heart was alternatively perfused with blood samples with normal and high oxygen affinity. The results of this study, analyzed with the aid of a mathematical model of oxygen delivery, suggest that changes in capillary density play an important role in adaptation to changes in O_2 affinity.

Material and Methods

Heart Preparation

The blood-perfused, working, isolated rat heart used in this study was described in detail previously by *Duvelleroy et al.* [1976]. The perfusate, introduced into the left atrium

[1] Supported by contract 74-7-0274 from DGRST, 76-1-1755 from INSERM and a grant from the University Paris VII.

at constant pressure, was pumped by the left ventricle against a hydrostatic pressure head. A small catheter placed in the pulmonary artery allows for collection of coronary sinus drainage from the right ventricle for blood gas analysis. Coronary blood flow and aortic flow are measured during collection into a graduated container for 1 min. Blood gas exchange was achieved via a small capillary or membrane oxygenator. The circuit includes several blood filters. The left atrium can be perfused from two separate circuits, each containing a different perfusate.

The perfusion apparatus has been improved recently so as to eliminate the blood gas interface and to permit a continuous recording of coronary blood flow, aortic flow and coronary sinus P_{O_2}. The preparation is stable over a period of 5 h. The hemodynamic performance characteristics are the following (mean value of 60 experiments ± SEM): aortic flow: 84 ± 2 ml min^{-1} g^{-1}, coronary flow: 6.4 ± 0.25 ml min^{-1} g^{-1} (expressed in grams of wet ventricle weight), heart rate: 360 ± 7 beats/min. In all experiments presented in this paper, the left atrial pressure was kept at 13 mm Hg and the mean aortic pressure at 70 mm Hg.

Perfusate

The perfusate consisted of a Krebs-Henseleit bicarbonate buffer with added calcium EDTA (0.5 m*M*), sodium pyruvate (2.0 m*M*) and bovine serum albumin (fraction V, 1.5%) used as a suspending medium for washed fresh pig or adult human ACD stored erythrocytes.

Results

The effect of a decrease in P_{50} was evaluated by perfusion of the heart with adult human erythrocytes containing abnormal hemoglobin: hemoglobin Creteil, with a P_{50} of 13 mm Hg [*Poyart et al.*, 1978].

A typical experiment using abnormal hemoglobin is shown in figure 1. When the heart was perfused with the normal human erythrocytes, the P_{50} was 21.5 mm Hg, the coronary blood flow ($\dot{Q}$) was 3.6 ml/min, and the coronary sinus P_{O_2} (PCS_{O_2}) was 19 mm Hg. When the heart was perfused with the high O_2 affinity hemoglobin ($P_{50} = 9$ mm Hg), coronary blood flow increased to 4.8 ml/min, PCS_{O_2} decreased to 13 mm Hg, coronary sinus O_2 content increased from 0.085 to 0.104 ml/ml, and myocardial O_2 consumption ($M\dot{V}_{O_2}$) did not change (0.270 ml/min). Perfusion with control blood was followed by the return of these variables to control values. The mean value of nine experiments using abnormal hemoglobin is shown in table I. As the P_{50} decreased from 25 to 10 mm Hg, PCS_{O_2} fell from 26 ± 2 to 18.3 ± 1.7 mm Hg (–29 ± 2%) and CCS_{O_2} increased by 15 ± 3%; $M\dot{V}_{O_2}$ did not change significantly. The increase in coronary blood flow ($\dot{Q}$) of 23 ± 3.8% was significant. In some experiments, the P_{50} was decreased to 5 mm Hg by

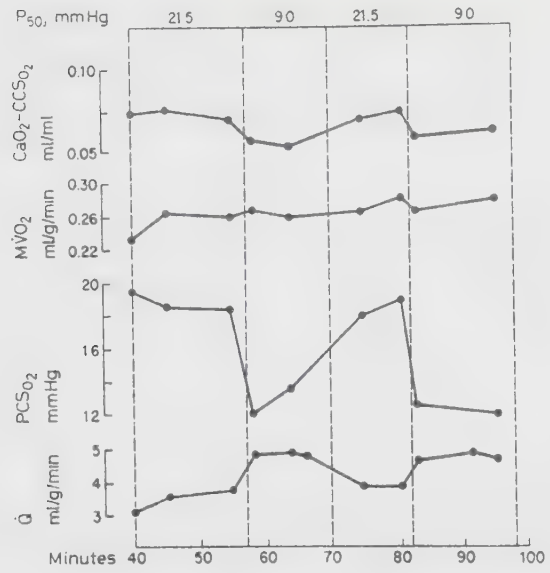


Fig. 1. Effect of a change of hemoglobin O_2 affinity on O_2 delivery in a blood-perfused, working isolated rat heart. In this experiment, the P_{50} of control blood was initially 21.5 mm Hg. A decrease of P_{50} to 9 mm Hg, obtained by the use of abnormal hemoglobin 'Creteil', is associated with an increase in coronary blood flow ($\dot{Q}$), and a decrease in a-vO_2 concentration difference. A return to control values of the P_{50} was associated with the reverse change. $M\dot{V}_{O2}$ remained constant.

addition of sodium cyanate to the abnormal hemoglobin (fig. 2). This drastic change in P_{50} produced a marked increase in coronary blood flow (16 instead of 6 ml min^{-1} g^{-1}) associated with a decrease in aortic flow (50 instead of 80 ml min^{-1} g^{-1}), and a decrease in $M\dot{V}_{O2}$ (0.288 instead of 0.358 ml min^{-1} g^{-1}).

Simple Model of Oxygen Delivery to Tissue

The purpose of this model is to provide a simplified display of the relationship between myocardial oxygen consumption, coronary blood flow, and coronary venous oxygenation, when the hemoglobin O_2 affinity is altered. The theoretical aspects of oxygen delivery have already received ample attention, whereas the potential consequences of a change in O_2 affinity have not been established.

Table I. Effect of a decrease of P_{50}

P_{50} mm Hg	CaO_2 ml/ml	PCS_{O2} mm Hg	CCS_{O2} ml/ml	$\dot{Q}$ ml min^{-1} g^{-1}	AF ml min^{-1} g^{-1}	$M\dot{V}_{O2}$	K ml O_2 min^{-1} $mm\ Hg^{-1}$ g^{-1}
25	0.109	26	0.062	6.4	68	0.269	0.0100
±2	±0.01	±2.1	±0.005	±1.2	±8	±0.02	±0.0008
10	0.109	18.3	0.071	7.75	56	0.252	0.0199
±1	±0.01	±1.7	±0.006	±1.4	±7.6	±0.12	±0.0009
		p = 0.02	NS	NS	NS	NS	p = 0.0005
Percent change		–29	+15	+23	–18	– 4	+104
		±2	± 3	± 3	± 4	±5	± 15
		p = 0.001	p = 0.005	p = 0.001	p = 0.005	NS	p = 0.0005

Mean value ±SEM, n = 9. CaO_2 = Arterial O_2 content, $\dot{Q}$ = coronary blood flow, $M\dot{V}_{O2}$ = myocardial oxygen consumption, PCS_{O2} and CCS_{O2} = partial pressure and O_2 content of coronary sinus blood, AF = aortic flow. The coefficient K was computed from the following equation obtained with the model described in the text.

$$K = \frac{M\dot{V}_{O2}}{PCS_{O2} \dfrac{PI_{CO} \cdot M\dot{V}_{O2}}{V_{max} - M\dot{V}_{O2}}}$$

PI_{CO} = 2 mm Hg, V_{max} = 0.6 ml min^{-1} g^{-1}.

This simplified model is composed of two compartments. One compartment consists of the capillary. The other lumps the adjacent extra- and intracellular space together. Oxygen is assumed to move by passive diffusion from one compartment to the other, with resistance to diffusion assumed to be located in a hypothetical membrane which separates both compartments.

Myocardial oxygen delivery, $M\dot{V}_{O2}$ (ml min^{-1} g^{-1}) can be described by the following equations. The convection equation

$$M\dot{V}_{O2} = \dot{Q}\,(CaO_2 - CCS_{O2}) \quad (1)$$

where CaO_2 is the arterial O_2 content (ml/ml), CCS_{O2} is the coronary sinus O_2 content (ml/ml), $\dot{Q}$ is the coronary blood flow (ml min^{-1}). The diffusion equation

$$M\dot{V}_{O2} = K\,(PCS_{O2} - PI) \quad (2)$$

where PCS_{O2} is the coronary sinus P_{O2}, PI is the actual intracellular P_{O2}, and K a global diffusion coefficient (ml min^{-1} g^{-1} mm Hg^{-1}) which reflects

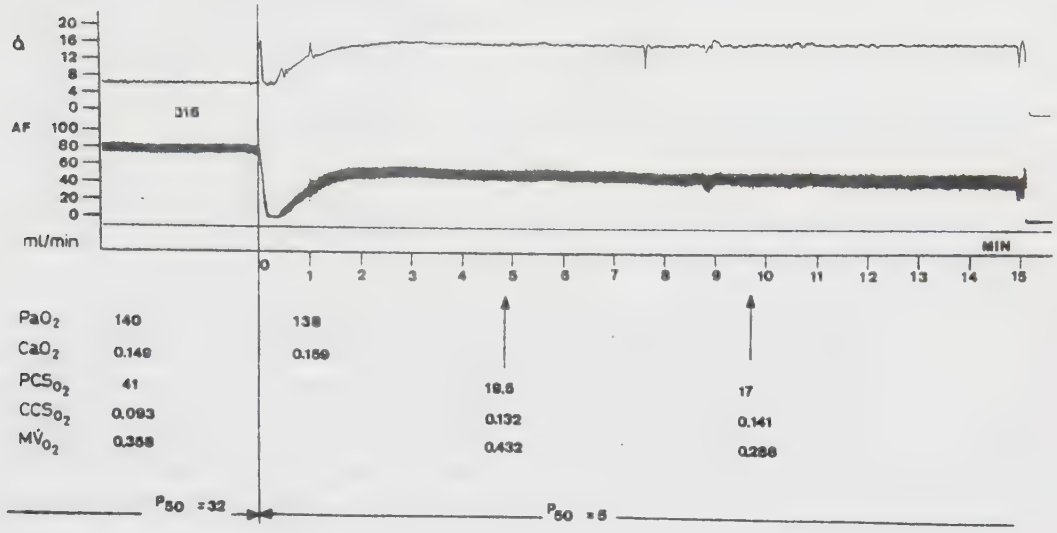


Fig. 2. Dynamic response of coronary blood flow ($\dot{Q}$) and aortic flow (AF) to a drastic change in P_{50}. The $\dot{Q}$ which equals 6 ml min^{-1} with the control blood (P_{50}= 32 mm Hg) reaches 16 ml min^{-1} within 2 min, when the P_{50} is 5 mm Hg. After a transient period aortic flow and $M\dot{V}_{O_2}$ decrease.

changes in perfused capillary density. The O_2 consumption equation which was expressed according to Michaelis-Menten kinetics

$$M\dot{V}_{O_2} = V_{max} \frac{PI}{PI + PI_{CO}} \quad (3)$$

where V_{max} is the maximal value of O_2 consumption, PI_{CO} the critical intracellular P_{O_2}, arbitrarily assumed to be 2 mm Hg. For any value of CaO_2, $\dot{Q}$, K, V_{max} and PI_{CO}, the combination of the equations 1, 2 and 3 results in a unique equation between CCS_{O_2} and PCS_{O_2}, which is called 'the oxygen distribution curve', and which can be drawn on the same graph as the oxygen dissociation curve. The intersection between these two curves defines a unique value for $M\dot{V}_{O_2}$ and both O_2 content and P_{O_2} of coronary venous blood, as determined by coronary blood flow ($\dot{Q}$), capillary density K, and O_2 affinity. This is shown in figure 3. The effect of a shift to the left of the HbO_2 curve is shown in figure 4. If the shift would occur without any change in $\dot{Q}$ or K, $M\dot{V}_{O_2}$ would decrease from 0.32 to 0.25 ml min^{-1} g^{-1}. An increase in $\dot{Q}$ (4.5 ml min^{-1} g^{-1}) associated with an increase in K (0.023 ml min^{-1} mm Hg^{-1} g^{-1}) would permit to keep $M\dot{V}_{O_2}$ constant at

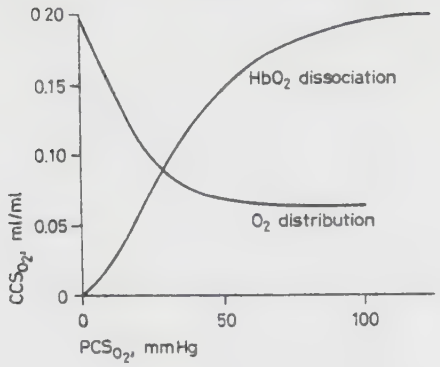


Fig. 3. Graphic solution of the simplified model of O_2 delivery. The O_2 distribution curve is a plot of the relationship between CCS_{O2} and PCS_{O2} derived from the model. This curve indicates that an increase in PCS_{O2} results in a decreased venous O_2 content, i.e., an increased partial pressure gradient from the extra- to the intravascular compartment enhances the movement of O_2 out of the blood. The intersection of this curve with the HbO_2 dissociation curve defines the position of the venous point and therefore the value of myocardial O_2 consumption.

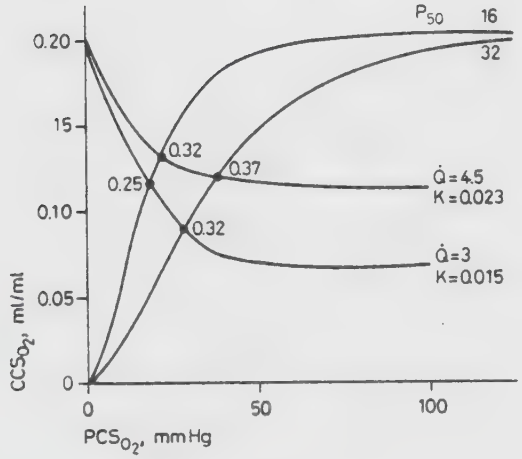


Fig. 4. Graphic analysis of hemoglobin O_2 affinity effects on myocardial oxygen delivery. A shift of the HbO_2 curve to the left, without adaptation of flow ($\dot{Q}$) or capillary density (K) would result in a decrease in $M\dot{V}_{O2}$ from 0.32 to 0.25 ml min^{-1}. The same O_2 supply can be maintained in the presence of a decrease in P_{50}, if both flow and capillary density increase.

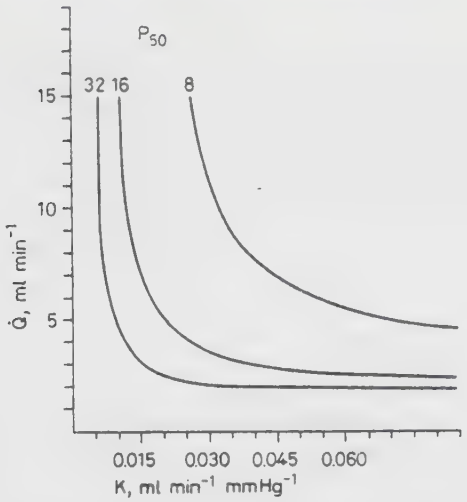


Fig. 5. Coronary blood flow ($\dot{Q}$) as a function of K at $M\dot{V}_{O_2} = 0.32$ ml min^{-1} for three values of P_{50}. The increase of coronary flow required to keep $M\dot{V}_{O_2}$ constant is greatly reduced by an associated increase in capillary density.

0.32 ml min^{-1}. The venous point moves upward and to the left, as was found experimentally.

Capillary recruitment, as shown by *Martini and Honig* [1969], plays an important role in the rat heart in hypoxic situations. Oxygen delivery is controlled by two variables, flow ($\dot{Q}$) and capillary density, represented in our model by the global diffusion coefficient K. A plot of $\dot{Q}$ versus K for the same value of $M\dot{V}_{O_2}$ (isoM$\dot{V}_{O_2}$ curve) is shown in figure 5 with three different values of P_{50}: 32, 16 and 8 mm Hg.

A decrease of P_{50} to half its control value (assumed to be 32 in this example) can be easily compensated if an increase of K is associated with an increase of $\dot{Q}$. But the relationship is not linear and the increase in $\dot{Q}$ and K becomes extremely important for low values of P_{50}. The nature of the controlling mechanism by which capillary density increases when P_{50} decreases cannot be completely elucidated from these experiments. It seems, however, that the high affinity impedes O_2 diffusion to the cell. Then by some control feedback, the precapillary sphincters open, and a larger number of capillaries are perfused to allow a return of the P_{O_2} to its previous value.

Conclusion

Relative small changes of the P_{50} as observed in clinical practice are probably of minor importance as long as the subject has a normal microcoronary circulation with the possibility of capillary recruitment. Conversely, the presence of abnormal microcirculation, or the existence of an associated blood abnormality (low hematocrit for example) can make the individual highly sensitive to changes in O_2 affinity.

References

Bakker, J.C.; Gortmaker, G.C.; Urolijk, A.C.M., and Offerijns F.G.J.: The influence of the position of the oxygen dissociation curve on oxygen dependent functions of the isolated perfused rat liver. Pflügers Arch. *362:* 21–31 (1976).

Duvelleroy, M.A.; Duruble, M.; Martin, J.L.; Teisseire, B.; Droulez, J., and Cain, M.: Blood perfused working isolated rat heart. J. appl. Physiol. *41:* 603–607 (1976).

Martini, J. and Honig, C.R.: Direct measurement of intercapillary distance in beating rat heart *in situ* under various conditions of O_2 supply. Microvasc. Res. *1:* 214–256 (1969).

Poyart, C.; Bursaux, E.; Teisseire, B.; Freminet, A.; Duvelleroy, M., and Rosa, J.: Hemoglobin Creteil: oxygen transport by erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. Studies in a high oxygen affinity mutant hemoglobin. Ann. intern. Med. *88:* 758–763 (1978).

Turek, Z.; Kreuzer, F., and Hoofd, L.J.: Advantage or disadvantage of a decrease of blood oxygen affinity for tissue oxygen supply at hypoxia. A theoretical study comparing man and rat. Pflügers Arch. *342:* 185–197 (1973).

Yhap, E.O.; Wright, C.B.; Popovic, N.A., and Alix, E.C.: Decreased oxygen uptake with stored blood in the isolated hind limb. J. appl. Physiol. *38:* 882–885 (1975).

Prof. M.A. Duvelleroy, Laboratoire de Biophysique, Hôpital Fernand Widal, 200, rue du Faubourg St-Denis, F-75010 Paris X (France)

BIOCHEMICAL MEDICINE 28, 324–339 (1982)

The Dependence of Cardiac Energy Metabolism on Oxygen Carrying Capacity

YANN GAUDUEL, JEAN LOUIS MARTIN, BERNARD TEISSEIRE, MICHEL DURUBLE, AND MICHEL A. DUVELLEROY

Department of Biophysics and Nuclear Medicine and Laboratory of Biophysics, Faculty of Medicine, Lariboisiere St. Louis, Fernand Widal Hospital, 75010 Paris, France

Received October 19, 1981

Mitochondrial respiratory rate is an essential component of myocardial function, because it influences ATP production during oxidative phosphorylation (1). Theoretical and experimental studies have shown a dependence of mitochondrial phosphorylation on oxygen tension (2–4). A quantitative description of oxygen dependence is essential to understand the biochemical and physiological problems which appear in the heart under different conditions such as hypoxia, ischemia, or change in oxygen carrying capacity. Some studies have shown changes in energy production and secondarily hemodynamic performance (5,6). It was known that variation of hematocrit, by changing the convective part of oxygen transport, could modify the quality of tissue oxygenation. Up to a given value (30% of hematocrit), the decrease in oxygen carrying capacity could be compensated for by a concomitant increase in flow related to the decrease in viscosity (7,8). From these different studies (9), it was also clear that a large decrease of hematocrit could be associated with a severe reduction in oxygen supply. Despite these facts, it was still common to perfuse isolated hearts of small animals with a red cell-free solution to study cardiac metabolism. However, the existence of hematocrit dependence on mitochondrial respiration rate and cellular energetic compound levels was not elucidated. This study, using a perfused heart model, has been carried out to evaluate the importance of hematocrit on energy metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male rats (body wt 200–300 g) of the Wistar strain, fed ad libitum were used.

0006-2944/82/060324-16$02.00
Copyright © 1982 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

Perfusion Technique

Hearts rapidly excised from ether-anesthetized animals were washed with cold isotonic saline solution. Retrograde perfusion through the aorta was initiated immediately before perfusion with a working heart apparatus designed to eliminate the blood–gas interface. Left atrial pressure and afterload were respectively 7 and 75 mm Hg. A small catheter was fitted into the pulmonary artery to determine venous O_2 content.

Perfusion Medium

The perfusate was reconstituted blood obtained by mixing 450 ml washed pig red cells with 550 ml of an electrolytic solution containing bovine albumin (1%). Final ionic concentrations were: NaCl (120 mM), KCl (5.9 mM), free Ca^+ (2.5 mM), $MgSO_4$ (0.5 mM), NaH_2PO_4 (1.2 mM), $NaHCO_3$ (28 mM). Glucose, pyruvate, and lactate were present to final concentrations in blood of 11, 1.2, and 0.9 mM.

The blood was oxygenated with the membrane oxygenator Travenol (5MO321) and a gas mixture consisting of O_2 (20%), CO_2 (6%), and N_2 (74%). The blood was carefully filtered through a filter (Swank filter IL 200, pore size 10-μm, Extracorporeal Medical Specialities Inc.).

Arterial O_2 content measured by Lex-O-Con (Lexington Instrument Corp.) was 15.3 ± 0.2 ml O_2/100 ml for a hematocrit of 35.8 ± 1.5%. The other parameters of arterial blood were: P_aO_2 135 ± 3 mm Hg, P_aCO_2 37 ± 2 mm Hg, and pH 7.4. In some experiments, the hearts were perfused with a modified Krebs–Henseleit buffer solution (hematocrit 0%): NaCL (118 mM), KCl (5.9 mM), free Ca^{2+} (2.5 mM), $MgSO_4$ (0.5 mM), NaH_2PO_4 (1.17 mM), $NaHCO_3$ (28 mM), glucose (11 mM), pyruvate (1.2 mM), lactate (0.9 mM), and bovine albumin (1%). The solution was equilibrated with 95% O_2, 5% CO_2. Arterial PO_2, PCO_2, and pH were respectively 500 ± 15 mm Hg, 34 ± 1 mm Hg, and 7.4. The arterial O_2 content was measured at 1.5 ± 0.05 ml O_2/100 ml solution. The whole perfusion apparatus was enclosed in a thermostatic chamber at 37°C. The perfusion system consisted of two symmetric circuits, incorporating the possibility for a sudden conversion from one perfusate to the other.

Time Sequence

Three groups of hearts spontaneously beating to 330 beats/min^{-1} were defined.

Group A. The hearts were perfused for 60 min with reconstituted blood, 35% hematocrit.

Group B. The hearts were perfused with blood for 45 min and then submitted to red cell-free perfusion (0% hematocrit) for 15 min.

Group C. The hearts were perfused according to the sequence: 45 min with blood, 15 min with electrolytic solution, and 10 min with blood again.

Time Preparation

At the end of each experiment, the hearts were quickly frozen by clamping between aluminum blocks cooled with liquid nitrogen. The freezing portion included only ventricular mass.

Analytical Methods

The tissue was pulverized to a fine powder in a mortar, precooled with liquid nitrogen, and homogenized with perchloric acid 0.6 N (3 ml for 500 mg of tissue). The homogenate was centrifuged for 25 min at 13,500*g* in a RC5 Super-Speed refrigerated centrifuge (Sorvall).

The supernatant fraction was decanted and neutralized with K_2CO_3 (3 M) or KOH (1.5 M) to a convenient pH, according to the compound to be assayed.

The metabolites were analyzed enzymatically, using a Perkin–Elmer dual-beam spectrophotometer equipped with thermostable cuvettes. Adenosine 5′-phosphate and 5′-diphosphate were measured by the enzymatic method of Jaworek *et al.* (10). Adenosine 5′-triphosphate and creatine phosphate were measured by the methods of Lamprecht and Trautshold (11) and Lamprecht and Stein (12).

Creatine was assayed by the method of Bernt *et al.* (13), and inorganic phosphate was measured by the colorimetric method of Gawehn (14).

The enzymes and chemical reagents used were of the finest grade and obtained from Boehringer–Mannheim. Tissue contents were expressed in micromoles per gram wet weight of heart.

Calculations

Myocardial oxygen consumption (MVO_2) was evaluated using the Lex-O-Con oxygen analyzer (Lexington Instrument Corp.). Arterial and venous samples of perfusate were taken. MVO_2 values expressed in microliters per minute per gram wet weight were calculated from coronary flow and the difference in arterial and venous content of the perfusate. Oxygen consumption values were converted in microgram atoms of oxygen per minute per milligram of mitochondrial protein using the ideal gas equation of state 2. According to the data of Carafoli *et al.* (15), a mitochondrial protein content of 65 mg per gram of heart was applied.

External cardiac work was computed as the product of mean aortic pressure, total flow, and a coefficient (1.33×10^{-4}) and was expressed as joules per minute per gram wet weight.

When the first two sites of mitochondrial oxidative phosphorylation were near equilibrium, the summation of the free energy change of the coupled reactions approached zero. This required the free energy of hydrolysis of ATP (Δ_G ATP) to be equal but opposite in sign to the free energy change of the associated oxidation–reduction reaction ($-nF\Delta E$),

$$\Delta_G\text{ATP} + nF\Delta E = 0. \quad [1]$$

The expression for the variations of redox potential of the associated oxidation–reduction couples (ΔE) was:

$$\Delta E = E_h\ \text{NAD}^+ - E_h\ \text{Cyt}\ c^{3+}. \quad [2]$$

The free energy change of oxidation–reduction was defined by the relation

$$\begin{aligned} nF\Delta E &= nF(E_h\text{NAD}^+ - E_h\ \text{Cyt}\ c^{3+}) \\ &= nF\left(0.06 \log \frac{\text{ATP}}{\text{ADP} \cdot P_i} - 0.042\Delta_{G'_o}\text{ATP}\right). \end{aligned} \quad [3]$$

At pH 7.4 and temperature 37°C,

$$-\Delta_G\text{ATP} = 7.6 + 1.42 \log \left(\frac{\text{ATP}}{\text{ADP} \cdot P_i}\right). \quad [4]$$

This first relationship enabled us to calculate the free energy change of the oxidation–reduction reaction. In the equation which defined the free energy change, cytosolic concentrations of ATP, ADP, and P_i corresponded to the free forms ATP_f, ADP_f, and $P_{i,f}$. In the cardiac cells, high energy compounds were compartmentalized or bound to protein to a different extent (16,17,18).

Calculations of free forms of energy compounds in sarcoplasm were performed with corrections due to compartmentation and binding.

In this study, and according to data given in the literature, cytosolic space of distribution was considered as 60% of wet weight.

Cytosolic concentrations of creatine phosphate (CP) and creatine (Cr) were calculated, assuming that compartmentation and binding were negligible (19),

$$\text{cytosolic CP and Cr contents} = x \cdot 5/3, \quad [5]$$

where x = analyzed tissue content of metabolites.

Cytosolic concentrations of ATP and P_i were determined by equations including correction of compartmentation and binding (16).

$$\text{cytosolic ATP concentration} = \frac{(x - 0.3)5}{3}. \quad [6]$$

$$\text{cytosolic } P_i \text{ concentration} = (x - (0.08x + 1.7))\ 5/3. \quad [7]$$

The ADP and AMP concentrations in cytosol were calculated from the Lohman reaction,

$$ADP + PC \leftrightharpoons ATP + Cr, \qquad [8]$$

and the adenylate kinase reaction,

$$2ADP \rightleftharpoons ATP + AMP. \qquad [9]$$

According to the hypothesis of Hohorst *et al.* (20), McGilvery and Murray (21), and Nishiki *et al.* (22), we had considered that in the three groups of hearts, creatine kinase and adenylate kinase reactions were near equilibrium "*in vivo*." The existence of near equilibrium of these reactions was substantiated by works of Saks *et al.* (23) in which the high activities of CPK and AK in the heart were observed. This study demonstrated that the mechanism of mitochondrial creatine phosphokinase reaction was of a quasi-equilibrium random type.

The equilibrium constants of these equations were

$$K_{CPK} = \frac{(ATP) \cdot (Cr)}{(ADP) \cdot (CP) \cdot (H^+)} = 1.51 \times 10^8 \text{ M}^{-1}, \qquad [10]$$

$$K_{AK} = \frac{(ATP) \cdot (AMP)}{(ADP)^2} = 0.363. \qquad [11]$$

In the expression of K_{CPK}, intracellular concentration of hydrogen ions could not be considered as constant in the three groups of hearts, if we considered the chemiosmotic theory of oxidative phosphorylation which was based on the existence of a proton gradient across the inner mitochondrial membrane (24).

The cytosolic pH was dependent on respiratory rate and in this study, we had chosen the relation established by Azzone *et al.* (25) to express variation of cytosolic pH. The cytosolic concentration of hydrogen ion was given by the equation

$$pH_c = 0.061\ VO_2 + 7.088. \qquad [12]$$

Using this relation, correction of (H^+) was operated in calculation of cytosolic ADP and AMP concentrations.

The knowledge of calculated values of free adenine nucleotides was used to assess the mitochondrial respiratory rate. Under different experimental conditions such as isolated mitochondria in state 4 and isolated perfused heart, the first two sites of mitochondrial oxidative phosphorylation were near equilibrium (1,3,26).

The reaction summarizing these first two oxidative phosphorylation sites in mitochondria was

$$NADH + 2Cyt\ c^{3+} + 2ADP + 2P_i \rightleftharpoons NAD^+ + 2Cyt\ c^{2+} + 2ATP, \qquad [13]$$

where NAD^+ and NADH were the intramitochondrial concentrations of the free nicotinamide adenine dinucleotides and ATP, ADP, and P_i were the cytosolic concentrations of free ATP, ADP, and P_i.

The equilibrium constant (K_{eq}) was defined by the expression

$$K_{eq} = ((NAD^+)/(NADH)) \cdot ((Cyt\ c^{2+})/(\text{Cyt } c^{3+}))^2 \cdot ((\text{ATP})/(\text{ADP} \cdot P_i))^2. \quad [14]$$

When the cellular oxygen concentration was sufficiently high to maintain K_{eq} at a constant value (3,4), the examination of the above relationship indicated that the intramitochondrial $(NAD^+)/(NADH)$ and $((\text{Cyt } c^{2+})/(\text{Cyt } c^{3+}))^2$ ratios varied in the direction opposite that of the calculated cytosolic ratio $((\text{ATP})/(\text{ADP} \cdot P_i))^2$ (3,4,22).

Statistical Evaluation

All results were expressed as means ± SEM. P values were calculated by an unpaired Student t test. $P < 0.05$ was taken as the limit of significance.

RESULTS

External Work and Oxygen Consumption

For the three groups of hearts, the results are summarized in Table 1. When hematocrit was decreased from 35 to 0%, the myocardial oxygen consumption was divided by two and external work significantly decreased from 0.82 to 0.28 J min^{-1} g^{-1} wet wt. These modifications were reversible if the heart was perfused again with hematocrit 35% (group C).

TABLE 1

EXTERNAL WORK (W) AND OXYGEN CONSUMPTION ($M\dot{V}O_2$) IN HEARTS PERFUSED WITH HEMATOCRITS OF 35 AND 0%

	HCT 35%: 60 min (n = 6)	HCT 35%: 45 min HCT 0%: 15 min (n = 6)	HCT 35%: 45 min HCT 0%: 15 min HCT 35%: 10 min (n = 6)
	(A)	(B)	(C)
$M\dot{V}^{O_2}$ (μg atom O min^{-1} mg^{-1} mitochondrial protein)	7.64 ± 0.40	3.40 ± 0.20**	6.15 ± 0.50*
W (J min^{-1} g^{-1} wet (wt)	0.820 ± 0.030	0.280 ± 0.020**	0.570 ± 0.040**

Note. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (B vs A and C vs A).

TABLE 2
TOTAL LEVELS OF HIGH ENERGY COMPOUNDS IN ISOLATED RAT HEART, PERFUSED WITH DIFFERENT HEMATOCRITS

	HCT 35%: 60 min	HCT 35%: 45 min HCT 0%: 15 min	HCT 35%: 45 min HCT 0%: 15 min HCT 35%: 10 min
	(A)	(B)	(C)
ATP	5.10 ± 0.20 (6)	2.90 ± 0.20 (6)**	4.35 ± 0.15 (6) ns
ADP	1.12 ± 0.05 (6)	0.98 ± 0.04 (6) ns	0.97 ± 0.04 (6) ns
AMP	0.18 ± 0.02 (6)	0.43 ± 0.06 (6)**	0.26 ± 0.03 (6) ns
P_i	6.00 ± 0.55 (6)	7.60 ± 0.70 (6)*	6.10 ± 0.55 (6) ns
CP	7.80 ± 0.55 (6)	7.75 ± 0.65 (6) ns	7.30 ± 0.75 (6) ns
Cr	7.05 ± 0.70 (6)	4.78 ± 0.55 (6)*	4.60 ± 0.35 (6)*

Note. Values were means ± SEM for the number of experiments in parentheses. The results are expressed in μmole g^{-1} wet wt.
* $P < 0.05$; ** $P < 0.02$; ns, not significant (B vs A and C vs A).

Total High Energy Compounds and Hematocrit

Table 2 summarizes myocardial levels of high energy compounds for the three groups of hearts. Overall, marked differences existed between hearts perfused with normal or low hematocrit. In absence of red cells in the perfusate (group B), a significant decrease in tissue content was noted for adenosine triphosphate (ATP) and creatine (Cr). However, adenosine monophosphate (AMP) and inorganic phosphate (P_i) levels were increased when the oxygen carrying capacity of the perfusate was decreased. The endogenous pools of adenosine diphosphate (ADP) and creatine phosphate (CP) were not modified by a variation in hematocrit from 35 to 0%.

Examination of the results for groups A and C showed that all the modifications observed at the end of the perfusion without red cells (group B) were reversible when the heart was perfused again with high hematocrit. The recuperation was almost complete for endogenous pools of ATP, AMP, and P_i. However, the myocardial level of creatine remained low compared to its initial value.

Effects of Various Hematocrits on Energetic Parameters of Hearts

When a steady state was achieved, after changing the oxygen carrying capacity of the perfusate, different energetic parameters were studied. The results are summarized in Table 3. Total adenine nucleotide (Σ ANP), ATP/AMP ratio, and total energy charge were largely influenced by hematocrit. These energetic parameters increased as the oxygen carrying capacity of the perfusion medium increased (groups A and C).

TABLE 3
EFFECT OF HEMATOCRIT ON ENERGETIC PARAMETERS OF ISOLATED PERFUSED RAT HEART

	HCT 35%: 60 min	HCT 35%: 45 min HCT 0%: 15 min	HCT 35%: 45 min HCT 0%: 15 min HCT 35%: 10 min
	(A)	(B)	(C)
ΣANP	6.45 ± 0.30 (6)	4.22 ± 0.25 (6)**	5.55 ± 0.45 (6) ns
ATP/AMP	27.0 ± 0.90 (6)	7.00 ± 0.50 (6)**	16.9 ± 1.00 (6)*
(ATP + ½ADP) /ΣANP	0.90 ± 0.05 (6)	0.78 ± 0.02 (6)**	0.86 ± 0.06 (6) ns

Note. Values were means ± SEM for the number of experiments in parentheses. The results are expressed in μmole g^{-1} wet wt.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.02$; ns, not significant (B vs A and C vs A).

Hematocrit and Free Adenine Nucleotides

Results relative to free adenine nucleotide contents in cardiac cytosol are given in Table 4. These calculated values were obtained with the equations described under Materials and Methods. It can be seen that appreciable changes in concentrations were obtained under different conditions of myocardial oxygenation. The higher the oxygen carrying capacity of the perfusate (group A and C), the higher were the free forms of ATP, ADP, and AMP. These results suggested that in hearts perfused with low hematocrit, major fractions of total ADP and AMP were bound

TABLE 4
INFLUENCE OF HEMATOCRIT ON CALCULATED FREE ADENINE NUCLEOTIDE CYTOSOLIC CONTENT IN ISOLATED PERFUSED HEARTS

	HCT 35%: 60 min	HCT 35%: 45 min HCT 0%: 15 min	HCT 35%: 45 min HCT 0%: 15 min HCT 35%: 10 min
	(A)	(B)	(C)
ATP_f	7.40 ± 0.30 (6)	4.20 ± 0.20 (6)**	6.60 ± 0.20 (6) ns
ADP_f	0.99 ± 0.02 (6)	0.315 ± 0.015 (6)**	0.81 ± 0.02 (6)*
AMP_f	0.048 ± 0.009 (6)	0.0095 ± 0.0005 (6)**	0.032 ± 0.001 (6)*
ATP_f/ADP_f	7.35 ± 0.20 (6)	13.3 ± 0.45 (6)**	8.25 ± 0.50 (6)*

Note. Corrections concerning cytosolic concentrations were performed as described in methods. Values were means ± SEM for the number of experiments in parentheses. The results were expressed in micromoles/g wet wt.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, not significant (B vs A and C vs A).

to intracellular proteins and that these fractions decreased under the physiological conditions of myocardial oxygenation.

Free Energy Changes

Cytosolic phosphorylation state and free energy changes in hearts perfused with different oxygen carrying capacities are shown in Table 5. The ratio $ATP_f/ADP_f \cdot P_{i,f}$ chosen as an index of cytosolic phosphorylation state increased significantly in hearts perfused with low arterial oxygen content as a reflection of the reduction of the extramitochondrial phosphorylation rate. Consequently, free energy changes (ΔATP) also increased significantly in hearts oxygenated with unphysiological hematocrit.

Energy State and Myocardial Oxygen Consumption

Relationships between oxygen consumption and different indexes of energy state are shown in Fig. 1. The extramitochondrial $ATP_f/ADP_f \cdot P_{i,f}$ ratio was a decreasing function of myocardial oxygen consumption. Conversely, the cytosolic free ADP level, which was higher in blood-perfused hearts, was concomitant with a high myocardial oxygen utilization (Fig. 1A). For different conditions of aerobic perfusion, there was a good correlation between cytosolic free ATP level and myocardial oxygen uptake (Fig. 1B).

DISCUSSION

The aim of this work was to define the importance of oxygen carrying capacity on cardiac energy metabolism and oxidative phosphorylation activity of myocardium. From a general viewpoint, a comparison of blood perfusion with 0% hematocrit perfusion was of interest in regard to the possibility that oxygen delivery from free red cell solutions might be limited to assume physiological cardiac activity.

TABLE 5
CYTOSOLIC PHOSPHORYLATION STATE AND FREE ENERGY CHANGES IN HEARTS PERFUSED WITH DIFFERENT OXYGEN CARRYING CAPACITY

Group	$ATP_f/ADP_f \cdot P_{i,f}$ (10^{-3} M^{-1})	Δ_G ATP (kcal/2ATP)
A. HCT 35%, $n = 6$	1.05 ± 0.03	11.8 ± 0.02
B. HCT 0%, $n = 6$	1.66 ± 0.07*	12.2 ± 0.06*
C. HCT 35% + 0% + 35%, $n = 6$	1.15 ± 0.05 ns	11.9 ± 0.01 ns

Note. * $P < 0.05$; ns, not significant. (B vs A and C vs A).

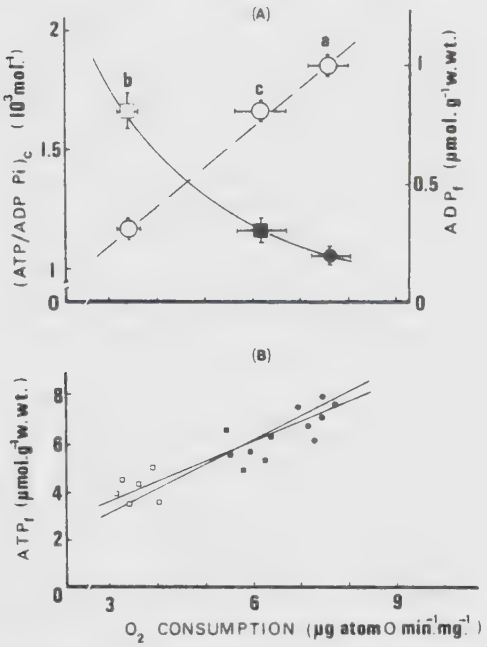


FIG. 1. (A) Relationship between myocardial oxygen consumption and cytosolic phosphorylation state (——) or cytosolic free ADP concentration (– – – –). Data represent three groups of experiments (a,b,c). Each point is the mean of six experiments ±SEM. Group a: blood perfusion for 60 min. Group b: blood perfusion for 45 min and electrolyte perfusion for 15 min. Group c: hearts alternatively perfused with blood (45 min), electrolyte solution (15 min), and blood again (10 min). (B) Second species linear regression between oxygen consumption and cytosolic free ATP concentration. $X = 5.6 + 1.04\,(Y - 5.68)$. $Y = 5.68 + 0.77\,(X - 5.6)$. $r = 0.90$. ●, Group a; □, group b; ■, group c.

An important point to be discussed in this work was the hypothesis used for the calculations of high energy compound concentrations. Calculations of the free forms of high energy compounds were corrected, taking extracellular space and compartmentation into consideration (27). Cytosolic concentrations of creatine phosphate and creatine were determined assuming compartmentation and binding to be negligible (28). It was more difficult to determine free forms of ATP, ADP, and AMP, because large amounts were bound in different cellular compartments. *In vivo*, the mitochondrial adenine nucleotide translocase and the creatine kinase isozyme interacted as a multistep enzyme complex (29). But it had been pointed out previously (20,21) that the concentrations of free ADP and AMP could be calculated assuming that creatine kinase and adenylate kinase reactions were at near equilibrium. Creatine kinase and adenylate kinase enzymes, present in high activities in cardiac muscle

(23), had mass action ratios (K_{CPK} and K_{AK}) which were very similar in cardiac tissue and *"in vitro"* (30). So, the existence of a near equilibrium in Lohman and adenylate reactions could be proposed. Recent results obtained by Nishiki *et al.* (22) and Giesen and Kammermeier (31) supported these methods of calculation of cytosolic free adenine nucleotides levels. Nicholls (32) had shown that cellular proton concentration was dependent on tissular respiratory activity. Consequently, cytosolic pH increased when respiratory rate was activated. In opposition to Neely's hypothesis (33), hydrogen ion concentration in cardiac muscle could not be assumed as constant when oxygen consumption was changing. Cytosolic hydrogen ion concentration was calculated according to methods of Azzone *et al.* (25). In this way, the chemiosmotic gradient hypothesis of Mitchell was preserved.

The hypothesis in which a state of near equilibrium of first two sites of mitochondrial oxidative phosphorylation was reached in isolated heart was tested in theory on experimental models (2,3,4). Moreover, in isolated perfused heart under a different work load, Nishiki *et al.* (22) had shown the existence of a near equilibrium between the phosphorylation state of the adenine nucleotide system and mitochondrial redox reactions. Under these conditions, if equilibrium constant K_{eq} was stable, the decrease of mitochondrial $NAD^+/NADH$ and Cyt c^{2+}/Cyt c^{3+} ratios was obviously associated with an increase of the cytosolic phosphate potential ($ATP_f/ADP_f \cdot P_{i,f}$). This situation corresponded to a decrease in oxygen consumption and a limitation of mitochondrial respiratory rate.

Under blood perfusion (hematocrit 35%), myocardial oxygen consumption was high. To maintain this same value with bicarbonate buffer perfusion (hematocrit 0%), the coronary flow should have increased, even if we considered total oxygen extraction, up to 32 ml $min^{-1} g^{-1}$ wet wt. As a matter of fact, the mean values of coronary flow for hematocrits of 35 and 0% were respectively 6.6 and 15.5 ml min^{-1} g wet wt. So the decrease in vascular resistance due to the low value of viscosity and the vasomotor adaptation was not sufficient to maintain the same oxygen supply with blood and free red cell solution. The myocardial oxygen consumption obtained during bicarbonate buffer perfusion was similar to values defined by other authors (33,34) in isolated working hearts and was consistent with the studies of Gump *et al.* (35) on the whole dog. The significant change in cardiac utilization of oxygen between normal and low oxygen carrying capacity of the perfusate was associated with a corresponding marked decrease in the external work.

The cellular respiratory activity of cardiac muscle could be estimated by ATP/AMP ratio. This ratio which was a good index of mitochondrial oxidative function efficiency (36) was dependent on the oxygen carrying capacity of the perfusion medium. A high arterial oxygen content (he-

matocrit 35%) was required to maintain physiological cellular respiratory function.

The changes in cardiac energy metabolism, observed for different hematocrits, were due to modifications in cardiac oxygen availability since it was the only parameter which was modified during this study. It was apparent that variation in oxygen carrying capacity of the perfusate was associated with a set of marked changes in the total adenine nucleotide content. Cellular ATP concentration was an increasing function of myocardial oxygen consumption. A correlation between these two parameters was also found in the whole rat or guinea pig by Pelosi *et al.* (38). So, the hematocrit modulated the cardiac oxygen uptake and secondarily the state of the cellular ATP reservoir. It was under conditions of physiological perfusion (hematocrit 35%) that the cellular ATP level, which represented the only immediate source of energy for muscular activity, was the most adapted to assure a high cardiac mechanical performance. The creatine phosphate compartment was not eliminated (Fig. 2a) by the limitation of oxygen delivery (SO_2T). The absence of parallel evolution between cellular ATP and CP levels was already observed by Gubdjarnason *et al.* (27) and Yipintsoi *et al.* (39). The creatine phosphate

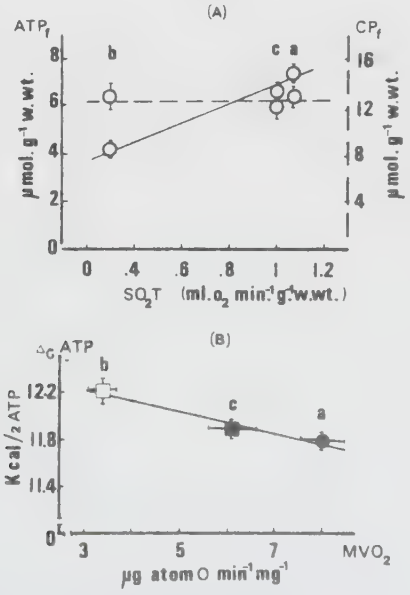


FIG. 2. (A) Influence of oxygen delivery rate (SO_2T = arterial oxygen content · coronary flow) on cytosolic free ATP and CP concentrations in isolated hearts. Each point is the mean of six hearts ±SEM. (B) Relationship between oxygen consumption and variation of free energy change for ATP synthesis (Δ_G ATP). Each point is the mean of six hearts ±SEM. Groups a–c were defined in Fig. 1.

was not selective enough to reflect the quality of myocardial oxygenation. The decrease in creatine level during perfusion with a 0% hematocrit could be explained by a leak through cell membranes. Such a leak of creatine was described in abnormal circumstances as cardiac hypoxia. With the myocardium being deprived of enzymatic systems to synthesize creatine *"de novo"* (40), it was not surprising that creatine failed to return to its previous value during reperfusion with a hematocrit of 35% (group C).

The energy charge (ATP + $\frac{1}{2}$ADP/ANP) of myocardium (37) was also dependent on the quality of oxygen transport to tissue. In the presence of red cell-free perfusion, the energy charge was depressed and the control effect of this parameter on key enzymatic reactions such as phosphofructokinase (37) could be altered. In this way, the biochemical function of molecular oxygen on aerobic metabolism could be modified when the heart was perfused with high oxygen pressure but low oxygen carrying capacity.

The effects of arterial oxygen content on free adenine nucleotide contents and fractions were significant. In an actively beating heart perfused with blood, the major fraction of cytosolic ADP was not bound to intracellular proteins. The relationship between cytosolic free ADP concentration and myocardial oxygen consumption could be interpreted as a direct effect of ADP on mitochondrial oxidative phosphorylation activity (41). During perfusion with a hematocrit of 0%, the decrease of myocardial oxygen availability depressed cytosolic free ADP content and secondarily mitochondrial oxidative function until a new equilibrium between oxygen supply and oxygen requirement was reached.

It was notable that with our whole heart preparation we found the same relationship between the cytosolic ATP_f/ADP_f ratio and myocardial oxygen consumption that Altschuld and Brierley (28) found in isolated mitochondria preparation. The oxidative activity of mitochondria was a decreasing function of the cytosolic ATP_f/ADP_f ratio and could be stimulated in blood-perfused hearts because this ratio remained low. Inversely, during free red cell perfusion the cardiac oxidative phosphorylation was depressed because the high ATP_f/ADP_f ratio inhibited cellular respiration (28).

The cytosolic phosphorylation potential ($ATP_f/ADP_f \cdot P_{i,f}$) was chosen to relate to mitochondrial respiratory activity and to measure the cytosolic phosphorylation state of cardiac muscle. According to studies of Hassinen *et al.* (42), a low cytosolic phosphate potential is associated with a high myocardial oxygen utilization (hematocrit 35%) and the inverse applies when the oxygen carrying capacity of the perfusion medium is reduced (hematocrit 0%). These results indicated that in an intact heart, mitochondrial respiration was influenced by the oxygen carrying

capacity of the perfusion medium and was regulated, in the same way as in mitochondrial suspension, by the cytosolic phosphorylation potential.

The free energy required to synthetize ATP (Δ_G ATP) was changed when the quality of oxygen transport to tissue was altered in the perfused heart. If the oxygen, the terminal electron transport, was transported under high arterial pressure and low arterial content (hematocrit 0%), then the free energy Δ_GATP was lowered because the state of the oxidation–reduction potential of the cytochromes in the respiratory chain was altered, Fig. 2b.

In conclusion, acute reduction of hematocrit was well tolerated as long as the oxygen carrying capacity of the perfusate was sufficient to provide proper cardiac oxygenation and to maintain a dynamic balance between oxygen demand and oxygen supply.

With red cell-free perfusion, oxygen delivery became a real limiting factor for cardiac function, mitochondrial oxidative phosphorylation activity, and cellular energetic efficiency. In the presence of perfusion with low oxygen carrying capacity, the isolated working heart was in a state of reversible dysoxia (43). This state could be characterized by a limited adaptation of cardiac performance and by a reversible disturbance of cellular energy metabolism. The reconstituted blood permitted perfusion of the cardiac muscle with physiological arterial oxygen pressure and oxygen carrying capacity. The cardiac activity was enhanced because myocardial oxygen utilization was more adapted to maintain a high mitochondrial respiratory activity. Under these conditions, the cytosolic phosphorylation state was stimulated and the efficiency of cardiac energy metabolism was enlarged.

SUMMARY

The influence of oxygen carrying capacity on cardiac energy metabolism was evaluated in isolated working hearts. Three groups of six hearts were studied. Group A (control) hearts were perfused with reconstituted blood, hematocrit 35%, arterial O_2 content 13.5 ml O_2/100 ml. Group B included hearts first perfused with blood, then perfused with a red cell-free electrolyte solution: hematocrit 0%, arterial O_2 content 1.5 ml O_2/100 ml. Group C hearts were alternatively perfused with blood, electrolyte solution, and then blood again.

The decrease in hematocrit from 35 to 0% was characterized by a restriction in oxygen consumption from 7.64 to 3.40 μg atom O min^{-1} mg^{-1} mitochondrial protein, in external work from 0.82 to 0.28 Je. min^{-1} g^{-1} wet wt, and in cellular ATP concentration from 5.1 to 2.9 μmole g^{-1} wet wt. These modifications were associated with a significant reduction in the calculated free forms of cytosolic adenine nucleotide concentrations. An important issue of this study was the constancy of creatine

phosphate concentration (A,7.8; B,7.75, C,7.30 μmole g^{-1} wet wt) although the arterial O_2 content was varied, contrasting with the significant variation of cellular ATP level.

The rate of oxidative phosphorylation, defined by the ATP_f/ADP_f $P_{i,f}$ ratio, was a function of oxygen consumption. This parameter was correlated to the cellular pool of ATP.

It could be inferred that (i) creatine phosphate concentration did not necessarily reflect the quality of myocardial oxygenation; (ii) the oxygen supply became a limiting factor of mitochondrial respiratory rate in the absence of hemoglobin in the perfusate. The effect of this limiting factor was expressed as a reduction in the activity of cellular oxidative metabolism; (iii) utilization of reconstituted blood permitted normal arterial oxygen pressure, and was able to maintain the physiological capacity of cardiac energy metabolism.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by contracts from DGRST (74-7-0274) and INSERM (76-1-175-5) and grants from the University Paris VII and the Fondation pour la Recherche Médicale Française.

REFERENCES

1. Wilson, D. F., Stubbs, M., Oshino, N., and Erecinska, M., *Biochemistry* **13,** 5305 (1974).
2. Wilson, D. F., Owen, C. S., and Holian, A., *Arch. Biochem. Biophys.* **182,** 749 (1977).
3. Wilson, D. F., Erecinska, M., Drown, C., and Silver, I. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **195,** 485 (1979a).
4. Wilson, D. G., Owen, C. S., and Erecinska, M., *Arch. Biochem. Biophys.* **195,** 494 (1979b).
5. Shrago, E., Shug, A. L., Sul, H., Bittar, N., and Folts, J. D., *Circ. Res.* **38,** 175 (1976).
6. Reibel, D. K., and Rovetto, M. F., *Amer. J. Physiol.* **237,** H247 (1979).
7. Messmer, K., Lewis, D. H., Sunder-Plassman, N. L., Klovekorn, W. P., Mendler, N., and Hoppler, K., *Eur. Surg. Res.* **4,** 55 (1970).
8. Messmer, K., Sunder-Plassman, L., Klovekorn, W. P., and Hoppler, K., *Adv. Microcir.* **4,** 1 (1972).
9. Buckberg, G., and Brazier, J., *Bibl. Haematol.* **41,** 173 (1975).
10. Jaworek, D., Gruber, W., and Bergmeyer, H. U., *in* "Methods of Enzymatic Analysis" (H. U. Bergmeyer, Ed.), p. 2127. Academic Press, New York, 1974.
11. Lamprecht, W., and Trautchold, I., *in* "Methods of Enzymatic Analysis" (H. U. Bergmeyer, Ed.), p. 2101. Academic Press, New York, 1974.
12. Lamprecht, W., and Stein, P., *in* "Methods of Enzymatic Analysis" (H. U. Bergmeyer, Ed.), p. 1777. Academic Press, New York, 1974.
13. Bernt, E., Bergmeyer, H. U., and Mollering, H., *in* "Methods of Enzymatic Analysis" (H. U. Bergmeyer, Ed.), p. 1704. Academic Press, New York, 1974.
14. Gawehn, K., *in* "Methods of Enzymatic Analysis" (H. U. Bergmeyer, Ed.), p. 2234. Academic Press, New York, 1974.
15. Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovetti, F., and Kratzing, C., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **6,** 361 (1974).

16. La Noue, K. F., Bryla, J., and Williamson, J. R., *J. Biol. Chem.* **247,** 667 (1972).
17. Hassinen, I. E., and Hiltumen, K., *Biochim. Biophys. Acta* **408,** 319 (1975).
18. Kohn, M. C., Achs, M. J., and Garfinkel, D., *Amer. J. Physiol.* **234,** 158 (1977).
19. Altschuld, R. A., Merola, A. J., and Brierley, G. P., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **7,** 451 (1975).
20. Hohorst, H. J., Reim, M., and Bartels, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7,** 142 (1962).
21. McGilvery, R. W., and Murray, T. W., *J. Biol. Chem.* **249,** 5845 (1974).
22. Nishiki, K., Erecinska, M., and Wilson, D. F., *Amer. J. Physiol.* **234,** C73 (1978).
23. Saks, V. A., Chernousova, G. B., Gukovsky, D. E., Smirov, V. N., and Chazov, E. I., *Eur. J. Biochem.* **57,** 273 (1975).
24. Mitchell, P., (London) *Nature* **191,** 144 (1961).
25. Azzone, G. F., Pozzan, T., Massari, S., and Bradagin, M., *Biochim. Biophys. Acta* **501,** 296 (1978).
26. Erecinska, M., Veech, R. L., and Wilson, D. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **160,** 412 (1974).
27. Gubdjarnason, S., Mathes, P., and Ravens, K. G., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1,** 325 (1968).
28. Altschuld, R. A., and Brierley, G. P., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **9,** 875 (1977).
29. Moreadith, R. W., and Jacobus, W. E., *J. Biol. Chem.* **257,** 899 (1982).
30. Beis, I. E., and Newsholme, E. A., *Biochem. J.* **152,** 23 (1975).
31. Giesen, J., and Kammermeier, H., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **12,** 891 (1980).
32. Nicholls, D. G., *Eur. J. Biochem.* **50,** 305 (1974).
33. Neely, J. R., Liebermeister, H., Battersby, J., and Morgan, H. E., *Amer. J. Physiol.* **212,** 804 (1967).
34. Duvelleroy, M. A., Duruble, M., Martin, J. L., Teisseire, B., Droulez, J., and Cain, M., *J. Appl. Physiol.* **41,** 603 (1976).
35. Gump, F. E., Butler, H., and Kinney, J. M., *Ann. Surg.* **168,** 54 (1968).
36. Olson, R. E., Dhalla, N. S., and Sun, C. N., *Cardiology* **56,** 114 (1971).
37. Atkinson, D. E., *Biochemistry* **7,** 4030 (1968).
38. Pelosi, G., Conti, F., and Agliati, G., *Eur. J. Pharmacol.* **8,** 19 (1969).
39. Yipintsoi, T., Penpargkul, S., Ritzer, T., and Scheuer, J., *Amer. J. Physiol.* **237,** H696 (1979).
40. Seraydarian, M. W., and Artaza, M., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **8,** 669 (1976).
41. Lehninger, A. L., *in* "Bioenergetics" (W.A. Benjamin, Ed.), p. 89. Stanford Res. Inst., Menlo Park, Calif., 1974.
42. Hassinen, I. E., and Hiltunen, K., *Biochim. Biophys. Acta* **408,** 319 (1975).
43. Robin, E. D., *Bibl. Haematol.* **46,** 96 (1980).

* Article accepté pour."Advances in Experimental Medicine and Biology" (Sous presse, 1983).

DELETERIOUS EFFECTS OF OXYGEN RADICALS ON REOXYGENATED MYOCARDIAL CELLS .

Gauduel, Y. and Duvelleroy, M.A.

Laboratoire de biophysique, Fernand Widal Hospital, 200 rue du Faubourg St Denis, 75010 PARIS, FRANCE.

Introduction.

The oxygen deprivation induces severe damages in the cardiac muscle. The ultrastructural lesions, which include mitochondrial and cellular swellings and structural defects in cell plasma membranes, are accented by the duration of the hypoxic period, Hearse et al. (1973).

The oxygen paradox phenomenon is observed when the hypoxic myocardium is suddenly submitted to reoxygenation , Hearse et al. (1973,1978) , Gauduel et al. (1979), Ganote et al. (1979). Irreversible ultrastructural lesions are the consequence of the toxic effects of molecular oxygen :Feuvray and de Leiris (1975), Ganote et al. (1979). The mechanism of these cytotoxic effects are still imperfectly understood but are of fundamental importance in cardiology.

The purpose of the present study is to elucidate the hypothesis in which the survival of hypoxic heart submitted to reoxygenation involves a complicated interplay between the biological generation of very reactive oxygen free radicals and the ability, by the cells, to control the production of these chemical species. Selective extrinsic scavengers of oxygen free radicals are used: glutathione reduced form (GSH), catalase, superoxide dismutase (SOD) and α tocopherol.These compounds are powerfull tools for use in dissecting some of the complexities which characterize the relations between oxygen free radicals and cellular components.

Methods.

Male rats of the Wistar strain, weighting 300 to 350 g and fed ad libitum are used.

Hearts, rapidly excised from ether anesthetized animals, are washed and arrested with cold isotonic saline solution. Retrograde perfusion throught the aorta is operated at 90 cm H_2O of after load according to the technique of Langendorff (1895). The pulmonary artery is incised to allow complete coronary drainage.

The standard perfusion fluid is a modified Krebs Henseleit buffer. During the hypoxic perfusion, the hearts are K^+ arrested by increasing the concentration of potassium from 5.5 to 16 mM with a corresponding decrease in Na^+ concentration. During all experimental conditions, the high potassium concentration prevented the occurence of cardiac arrythmias. The aerobic perfusate is equilibrated with 95% O_2 and 5% CO_2. Arterial PO_2 and pH are respectively 670 mm Hg and 7.4. Anaerobic phase is produced with an electrolyte solution with N_2/CO_2 (95%/5%). Aortic oxygen pressure is less than 5 mm Hg.

The whole perfusion apparatus is included in a thermostatic chamber at 37°C.

The hearts are perfused in normoxic conditions for a 15 minutes equilibration period with Krebs Henseleit buffer containing glucose (11 mM). The hearts are then submitted to hypoxia for 60 minutes. After this period, the cardiac muscle is reoxygenated for 10 or 20 minutes.
Coronary flow is monitored and samples of the coronary effluent are collected at specified intervals for analysis. At the end of experiments, the hearts are blotted and weighted.

Drug treatment is operated during hypoxia or reoxygenation. Glutathione reduced form (Sigma G4251) is administered in the perfusion medium at 0.5 mM. Catalase (EC 1,11,1,6 Boehringer) from beef liver is pulse administered during hypoxia ($20\ 10^3$ Iu every 6 minutes). Superoxide dismutase (EC 1,11,1,1 Sigma) is pulse-administered through the aortic cannula at 280 Iu every 6 minutes during the entire hypoxic period (total injection 1 mg).αTocopherol (Sigma) is administered in the perfusion medium during the reoxygenation (total perfusion 70 mg).

Anaerobic energy production (ATP) in the absence of exogenous substrate is estimated from the lactate production, assuming that all lactate is derived from endogenous glycogen and that one glucose equivalent will yield 3 ATP molecules.
Lactate production, expressed as nmoles/min/g wet weight,is calculated from coronary flow and lactate concentration in the venous effluent. Lactate is measured according to the method of Gutmann and Wahlefeld (1974).

The release of macromolecules in the venous effluent is also studied to define the integrity state of cardiac cells. Creatine kinase activity (CK) is determined with the optimized method of Siegel and Cohen (1974), using a Perkin Elmer dual beam spectrophotometer equiped with thermostable cuvettes and an enzymatic calculator Perkin Elmer 5-100. The catalase activity is assayed according to the method of Aebi (1974) and expressed as Bergmeyer units.
The enzymes and chemical reagents used are of the first grade and obtained from Boehringer Mannheim and Sigma.

All the results are expressed as mean * standard error of the mean (SEM). P values are calculated by an unpaired Student's t-test and $P < 0.05$ is taken as the element of significance.

Results.

The effect of oxygen deprivation on lactate production is shown in the figure 1. This production is quickened in the first 30 minutes of hypoxia and secondarily depressed between 30 and 60 minutes of perfusion.

In comparison with untreated hearts, glutathione reduced form and superoxide dismutase limit lactate production during all the continuance of the oxygen deprivation.

Catalase does not influence the glycolytic activity of hypoxic hearts.

The results of anaerobic ATP production are summarized in table 1. In different groups of hearts, glycolytic ATP production is increased under hypoxic conditions. But the energetic production is severely depressed between 30 and 60 minutes of hypoxia. In consequence, net rate of ATP utilization is depressed if hypoxia is longer than 30 minutes. Superoxide dismutase and GSH limit the glycolytic ATP production and ATP utilization during hypoxic period. Exogenous catalase does not influenced the energy production of oxygen deprivated myocardium.

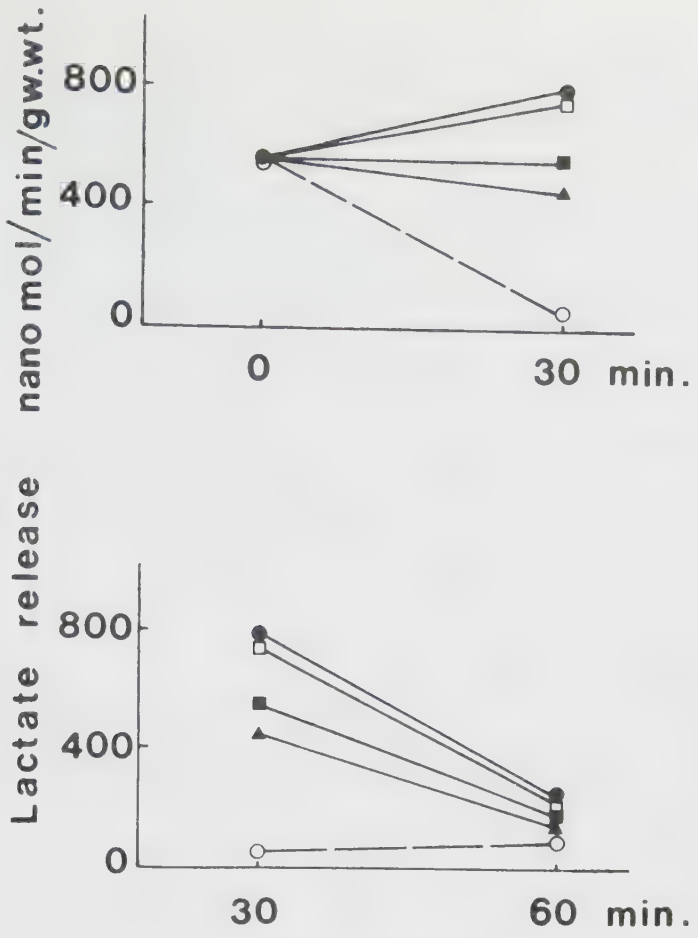


FIGURE 1 : Lactate production under a variety of hypoxic conditions. Each point represents the mean of five or six experiments.
○ normoxic hearts (6). Hypoxic hearts: ● untreated (6), ▲ +GSH (5), □ + Catalase (5), ■ + SOD (5).

TABLE I : Total glycolytic ATP production and net rate of ATP utilization under a variety of hypoxic conditions.

(2), (3), (4) vs (1) * $p < 0.05$ ns: not significant

NDITIONS	Total glycolytic ATP production (µmol ATP / g. wet weight)		Net rate of ATP utilization (µmol/min/g. wet weight)	
poxia (30 min)				
treated n=6	31 ± 3		1 ± 0.09	
H n=5	22 ± 2	*	0.75± 0.07	*
D n=5	25 ± 2	*	0.83± 0.05	*
talase n=5	29 ± 4	ns	0.98± 0.08	ns
poxia (60 min)				
treated n=6	56 ± 6		0.57± 0.06	
H n=5	36 ± 4	*	0.30± 0.03	*
D n=5	41 ± 3	*	0.36± 0.02	*
talase n=5	51 ± 5	ns	0.47± 0.05	ns

The integrity of cardiac cells can be estimated by the level of enzyme released in the venous effluent. Table II shows the patterns of creatinekinase and catalase released during 60 minutes of normoxic and hypoxic perfusions.
Untreated hypoxic hearts exhibit a biphasic CK release. An initial pick appears after 30 minutes and a second phase after 60 minutes of oxygen deprivation (figure 2).
Hypoxia increases also the pattern of catalase released in the coronary sinus but this kinetic is monophasic (table II).

TABLE II : Enzymes release in hearts perfused under normoxic and hypoxic conditions.
Each value represents the mean ± SEM of six hearts.

(3) vs (1) and (4) vs (2) *: $p < 0.05$ ns: not significant

Conditions	Enzymes	TIME (minutes) 0	15	30	45	60
Normoxia	1 CK (mIU/min/g)	35±2	-	38±4	-	30±2
	2 Catalase (mU/min/g)	15±3	13±2	17±3	14±1	15±3
		ns		*		*
Hypoxia	3 CK (mIU/min/g)	35±2	253±6	354±27	270±14	304±24
	4 Catalase (mU/min/g)	25±3	113±7	146±24	176±32	187±37
		ns	*	*	*	*

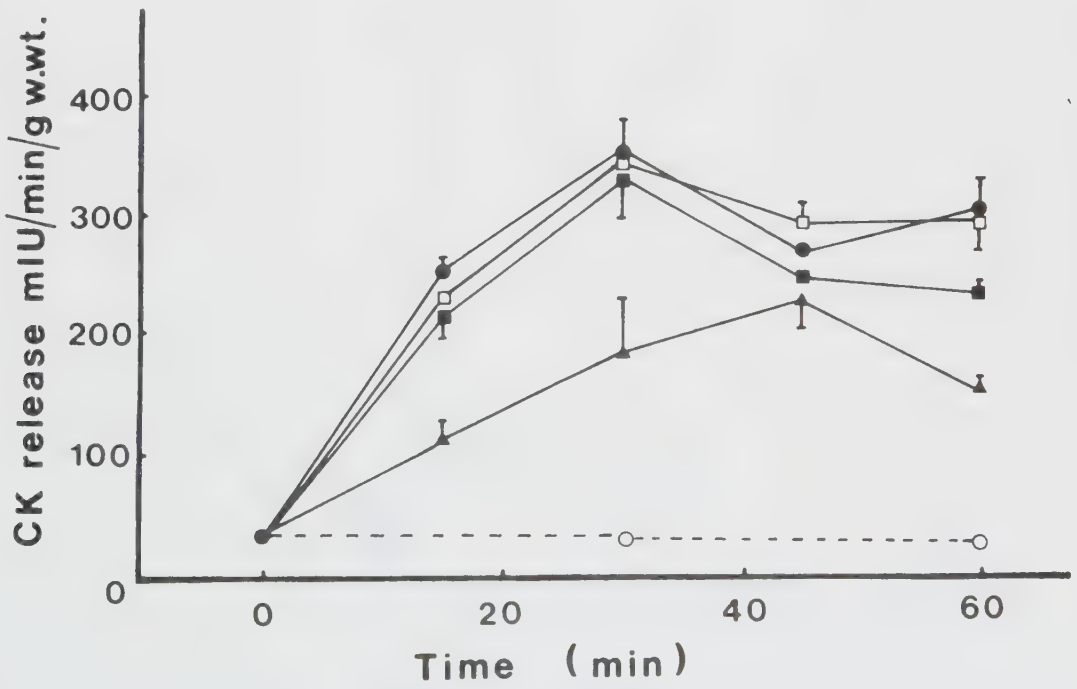


FIGURE 2 : Creatine kinase release kinetics from isolated perfused rat hearts following the onset of hypoxia. Each point represents the mean ±SEM of five or six experiments.
○ normoxic hearts (6). Hypoxic hearts: ● untreated (6), ▲ +GSH (5), □ + Catalase (5), ■ +SOD (5).

During hypoxia, pulsed administration of catalase and superoxide dismutase does not modified significantly the kinetic of CK release (figure 2).In contrast, glutathione reduced form delays the first phase of CK release. This phase appears after 45 minutes of oxygen deprivation.

In untreated hearts submitted to reoxygenation after 60 minutes of hypoxic perfusion, CK release is greatly increased (figure 3), an effect previously reported by several authors (Hearse et al.,1973; Ganote et al., 1975, Gauduel et al., 1979). This paradoxal effect of molecular oxygen is PO_2 dependent and is completely prevented when arterial PO_2 is lower than 150 mm Hg (figure 3). Glutathione reduced form, catalase and superoxide dismutase are effective in delaying or decreasing the CK release induced by high arterial PO_2 (670 mm Hg).

These scavengers of oxygen free radicals limit significantly the total CK released during the 10 minutes of reoxygenation (figure 4).

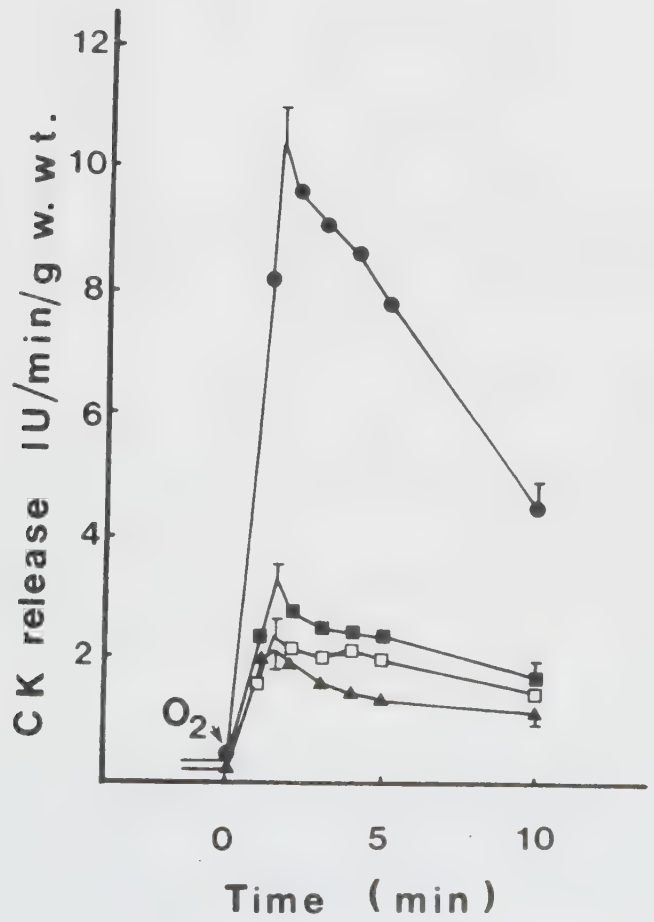


FIGURE 3 : Effect of reoxygenation on creatine kinase release from isolated perfused hearts previously submitted to hypoxia (60 minutes). Each point represents the mean of five or six experiments.
● untreated (6), ▲ GSH (5), □ Catalase (5), ■ SOD (5).

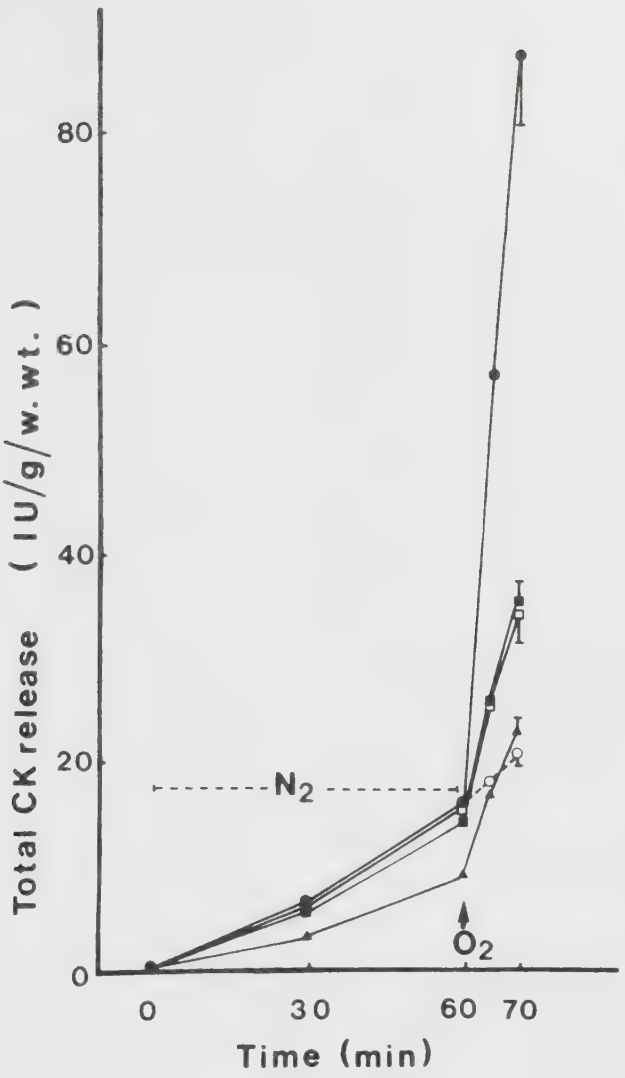


FIGURE 4 : Cumulative levels of Creatinekinase released during hypoxia (60 min.) and reoxygenation (10 min.) at high PO_2 (670 mm Hg) or low PO_2 (150 mm Hg).
● untreated hearts, PO_2:670 (6) - ○ untreated hearts, PO_2:150 (6)
▲ GSH, PO_2:670 (5) - □ Catalase, PO_2:670 (5)
■ SOD, PO_2:670 (5)

The oxygen paradox phenomenon can be largely prevented if α tocopherol is present during the reoxygenation (figure 5) . When the reoxygenation is continued for 20 minutes, the creatine kinase release increases progressively, but α tocopherol inhibits the development of abrupt alteration of myocardial cells during the post anoxic period.

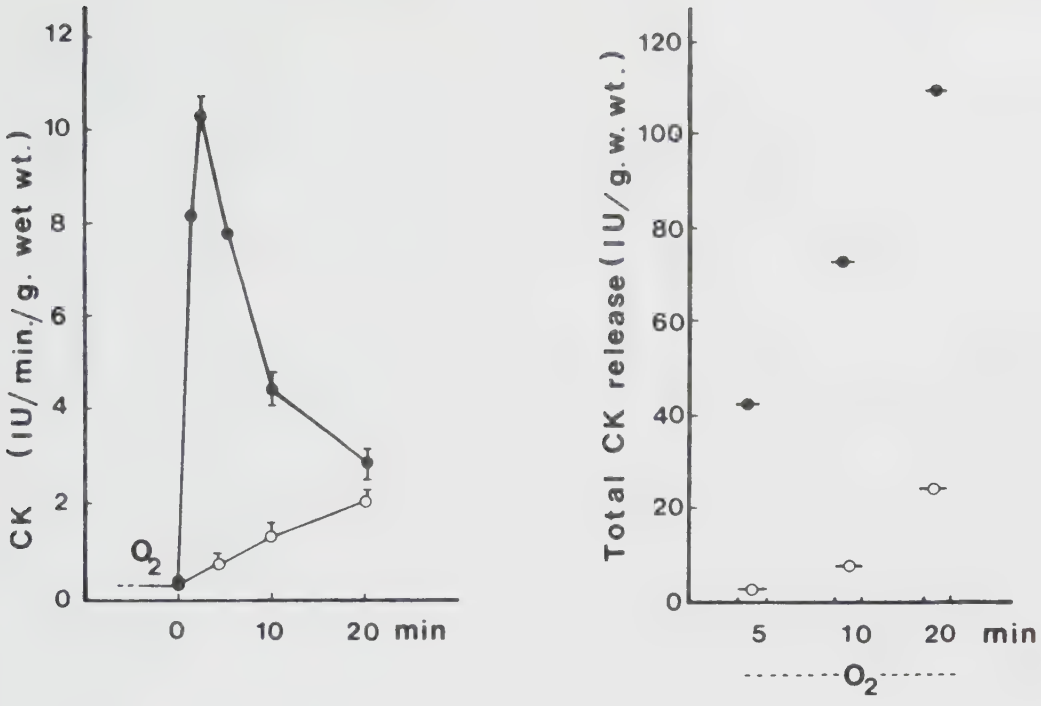


FIGURE 5 : Effect of α Tocopherol on CK release induced by the reoxygenation (PO_2=670 mm Hg) of hypoxic hearts.
Each point represents the mean ± SEM of five experiments.
a: kinetics of creatine kinase release.
b: Cumulative levels.
—●— untreated hearts , —○— hearts treated with α tocopherol.

Discussion.

This study, in accordance with previous works (Hearse et al, 1978; Gauduel et al., 1979; Ganote et al., 1979) provides evidence that a first phase of CK release appears after 30 minutes of oxygen deprivation and that a broad plateau occurs in the first 60 minutes of hypoxic perfusion. The release of catalase, which is an enzyme located in the matrix of the mitochondria (Nohl and Hegner, 1978), indicates that the cellular alterations produced by hypoxia are not only localized in cytosol but also in mitochondrial matrix and membranes.
The glutathione reduced form is used in this study with a concentration which cannot induce swelling or lysis of mitochondria (Hunter et al., 1964). This thiol compound which may have a scavenging potential in ionic environement of cells (Pryor, 1976; Kosower and Kosower, 1976), presents an hydrophylic protective mechanism during the oxygen deprivation. The GSH exerts a direct effect on membrane permeability

of hypoxic cells.This protective activity is probably enhanced by the limitation of the glycolytic activity and glycogen depletion in myocardium.
The exogenous catalase and superoxide dismutase do not protect the cardiac cells against the hypoxic injury. These enzymes have no effect of glycolytic activity of oxygen deprived myocardium. In accordance with study of Pryor (1966), these results show that oxygen free radicals are unlikely to play prominent role during hypoxic period since oxygen free radicals generation is limited in the absence of molecular oxygen.

One the first manifestations of hypoxic cardiac muscle injury is the sensitization of cells to molecular oxygen. The contribution of the univalent pathway to oxygen reduction has been investigated during the reoxygenation period. The elucidation of the relationship between the scavengers of oxygen free radicals and the oxygen induced enzyme release may aid in the understanding of the mechanisms which occur during the development of the oxygen paradox phenomenon. This work shows that the toxicity of oxygen can be significantly decreased during the reoxygenation if the oxygen free radicals scavenging mechanisms are preserved during hypoxia.
In unpathological conditions, the majority of the oxygen reduced by the normoxic cells is carried out tetravalently by cytochrome oxidase, without the release of intermediates(Antonini et al., 1970). But the contribution of the univalent pathway to oxygen reduction is practicable in pathological conditions of normoxia. In these conditions, the reduction of molecular oxygen stimulates the formation of powerful oxygen free radicals: hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion radical (O_2^-), hydroxyl radical ($OH^\bullet$).
Different protective and controlling mechanisms can be identified to prevent the release of H_2O_2, O_2^- and $OH^\bullet$ in the cells.
The oxidation-reduction state of the reduced glutathione-oxidized glutathione couple is of major importance in the defense of cells against oxygen toxicity. When the intracellular level of reduced glutathione (GSH) is maintained by the perfusion of exogenous GSH, the oxygen paradox phenomenon is forbided . This protective effect of GSH is probably dependent on several mechanisms. During the reoxygenation, GSH which is more easily available to oxygen that are other enzymes thiol groups, can inhibit the irreversible inactivation of enzymes such as glyceraldehyde 3 phosphate deshydrogenase (Haugaard, 1968). The GSH level which determines the activity of GSH peroxidase in the rat heart mitochondria (Nohl and Jordan, 1980), can also increase the damage of hydrogene peroxide (H_2O_2) and so reduce the toxic effect of this radical in the reoxygenated cells.
The ability of heart mitochondria to produce hydrogen peroxide is evident with the studies of Loschen et al. (1973), Nohl and Hegner (1978), Nohl and Jordan (1980). The catalase plays a fundamental role in the cellular metabolism of hydrogen peroxide (Chance et al., 1979). The matrix of mitochondria is altered during hypoxia and when the cardiac cells are reoxygenized the integrity of catalase system is inadequate to control the production of hydrogen peroxide in the mitochondria. This hypothesis is confirmed by the protective action of exogenous catalase obtained during the reoxygenation.
The hydrogen peroxide is also produced during the spontaneous dismutation of superoxide anion (Boveris, 1977).Actually, the punctual origin of O_2^- is unknown . But the alteration of mitochondrial function during hypoxia can reduce the detoxification of O_2 by the cytochrome oxidase.In these conditions, the formation of superoxide anion by the univalent pathway will be likely (Del Maestro,1980).

In our study, the role of superoxide anion radical in the development of oxygen paradox phenomenon can be reserved. Indeed, the superoxide dismutase (SOD), which accelerates the dismutation of O_2^- (Fridovich, 1975,1978), prevents the apparition of severe oxygen toxicity during the reoxygenation period.

The hydrogen peroxide and the superoxide anion are necessary intermediates in the initiation of lipid peroxidation (Fong et al., 1973, Halliwell, 1978). Although the role of Haber-Weiss reaction is debated in the biological systems (Czapski and Ilan, 1978), lipid peroxidation results in the interaction of unsaturated fatty acids with superoxide anion, hydroxyl radical and singlet oxygen ($O_2 {}^1\Delta g$), Halliwell (1978). The α tocopherol (vitamin E), a powerful scavenger of singlet oxygen, prevents chain propagating reactions in lipid membranes (Pryor, 1976, Halliwell, 1978). In our study, α tocopherol impedes the toxic effect of molecular oxygen during reoxygenation. This result suggests that the oxygen paradox includes the alteration of membrane components and the activation of lipid hydroperoxides formation (Narabayashi et al., 1982).

So, the development of paradoxal effect of molecular oxygen on the hypoxic cardiac muscle is dependent on cumulative processes including the alteration of mitochondrial function, the oxygen free radicals production, the chain propagating reactions in lipid membranes and the disruption of cell integrity.

References.

Aebi, H., 1974, in:"Methods of enzymatic analysis", H.U. Bergmeyer, ed., Academic Press, New York.

Antonini, E., Brunori, M., Greenwood, C., and Malmström, B.G., 1970, Catalytic mechanism of cytochrome oxidase, Nature, 228:936.

Boveris, A., 1977, in "Oxygen and physiological function", F.F. Jobsis, ed., Professional information library.

Chance, B., Sies, H., and Boveris, A., 1979, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, Physiol. Rev., 59: 527.

Czapski, G., and Ilan, Y.A., 1978, On the generation of the hydroxylation agent from superoxide radical. Can the Haber-Weiss reaction be the source of OH° radicals, Photochem. Photobiol., 28:651.

Del Maestro, R.F., 1980, An approach to free radicals in medecine and biology, Acta Physiol. Scan., Supl492:153.

Feuvray, D., and de Leiris, J., 1975, Ultrastructural modifications induced by reoxygenation in the anoxic isolated rat heart perfused without exogenous substrate, J. M. C. C., 7:307.

Fong, K.L., Mc Cay, P.B., Poyer, J.L., Leele, B.B. and MISRA, H., 1973, Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity, J. Biol. Chem., 248:7792.

Fridovich, I., 1975, Superoxide dismutases, Ann. Rev. Biochem., 44:147.

Fridovich, I., 1978, Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic life style, Photochem. Photobiol., 28:733.

Ganote, C.E., SEABRA GOMES, R., NAYLER, W.G., and JENNINGS, R.B., 1975, Irreversible myocardial injury in anoxic perfused rat hearts , Am. J. Path., 80:419.

Ganote, C.E., and Kaltenbach, J.P., 1979, Oxygen-induced enzyme release:early events and a proposed mechanism, J.M.C.C., 11:389.

Gauduel, Y., Karagueuzian, H.S., and de Leiris, J., 1979, Deleterious effects of endogenous catecholamines on hypoxic myocardial cells following reoxygenation, J.M.C.C., 11, 717.

Gutmann, I., and Wahlefeld, A.W., 1974, in:"Methods of enzymatic analysis", H.U. Bergmeyer, ed., Academic Press, New York.

Halliwell, B., 1978, Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase, Cell Biol. Inter. Reports, 2:113.

Haugaard, N., 1968, Cellular mechanisms of oxygen toxicity, Physiol. Rev., 48:312.

Hearse, D.J., Humphrey, S.M., and Chain, E.B., 1973, Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release, J.M.C.C., 5:395.

Hearse, D.J., 1978, The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem?, J.M.C.C., 10:641.

Hunter, F.E., Scott, J.A., Hoffsten, P.E., Gebicki, J.M., Weinstein, J., and Schneider, A., 1964, Studies on the mechanism of swelling lysis and distintegration of isolated liver mitochondria exposed to mixtures of oxidized and reduced glutathione, J. Biol. Chem., 239:614.

Kosower, N.S., and Kosower, E.M., 1976, The glutathione-glutathione disulfide system, in:"Free radicals in biology", W.A. Pryor, ed, Academic Press, London.

Langendorff, O., 1895, Untersuchungen am über lebender Saügertier herzen, Archiv. (Pflügers) ges. Physiol., 61:251.

Loschen, G., Azzi, A., and Flohe, L., 1973, Mitochondrial H_2O_2 formation: relationship with energy conservation, FEBS Letters, 33:89.

Narabayashi, H., Takeshige, K., and Minakami, S., 1982, Alteration of inner membrane components and damage to electron transfert activities of bovine heart submitochondrial particles induced by NADPH dependent lipid peroxidation, Biochem. J., 202:97.

Nohl, H., and Hegner, D., 1978, Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat heart mitochondria, FEBS Letters, 89:126.

Nohl, H., and Hegner, D., 1978, Do mitochondria produce oxygen radicals "in vivo"?, Eur. J. Biochem., 82:563.

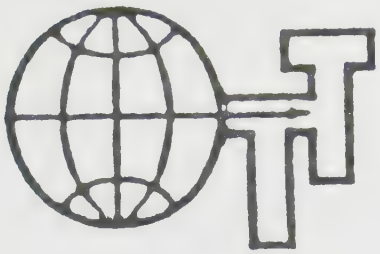
Nohl, H., and Jordan, W., 1980, The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide, Eur. J. Biochem., 111:203.

Pryor, W.A., 1966, "Free radicals", Mc Graw-Hill, New York.

Pryor, W.A., 1976, in"Free radicals in biology", W.A. Pryor ,ed., Academic Press, New York.

Siegel, A.L., and Cohen, P.S., 1974, in "Methods of enzymatic analysis", H.U. Bergmeyer, ed., Academic Press, New York.

I S O T T



INTERNATIONAL SOCIETY
ON
OXYGEN TRANSPORT TO TISSUE
LOUISIANA TECH UNIVERSITY
RUSTON, LOUISIANA, U.S.A.
AUGUST 16 - 20, 1983

DIRECT EFFECTS OF OXYGEN TOXICITY DURING THE CARDIAC "OXYGEN PARADOX"

Y. Gauduel and M. A. Duvelleroy, Laboratoire de Biophysique, Hopital Fernand Widal Paris

The toxicity of molecular oxygen is observed on the cardiac muscle, during a post hypoxic period, and the fundamental processes leading to this irreversible cellular injury remain imperfectly understood. The present study is conducted to investigate the temporal relationship among oxygen-induced cardiac cell damages, mitochondrial function and lipid peroxidation. An experimental model (isolated heart preparation) is submitted to sequential oxygen deprivation (15, 30, 60 minutes) and reoxygenation. The aerobic reperfusion is operated under low oxygen carrying capacity but high arterial oxygen pressure.

During the oxygen paradox phenomenon, cardiac injury is concomittant with the production of malonaldehyde. The extent of oxygen-induced lipid peroxidation is a function of the duration of the preceding period of hypoxia. Mitochondrial function, measured by polarographic studies, is progressively injured with oxygen deprivation and reoxygenation increases the damage of mitochondrial oxidative phosphorylation. In similarly experimental model, quenchers or scavengers of actived oxygen delay the development of irreversible injury induced by oxygen reperfusion. Oxygen-induced lipid peroxidation, enzyme release and mitochondrial alteration are reduced by glutathione reduced form and superoxide dismutase.

These results provide evidence that the interferences of oxygen derived free radicals in the oxidative attack of reoxygenated hearts are dependent on the duration of hypoxic period. The unphysiological activity of electron transport can lead to alteration of membrane mitochondria and to abnormal production of oxygen radicals. Therefore, the defects of oxidative metabolism will be one of the fast reaction which triggers the oxygen paradox phenomenon in the cardiac muscle. Consequently, the lipid peroxidation induces irreversible stress on myocardium, leading to tearing of cell membranes and swelling of mitochondria.

* Article accepté pour "Journal of Molecular and Cellular Cardiology". (Sous presse, 1983).

ROLE OF OXYGEN RADICALS IN CARDIAC INJURY DUE TO REOXYGENATION .

Yann GAUDUEL*§ and Michel A. DUVELLEROY

Department of biophysics and Nuclear Medicine, Laboratory of biophysics, Fernand Widal Hospital 75010 Paris, France.

Key words: Heart, hypoxia, reoxygenation, oxygen radicals, hydrogen peroxide, superoxide anion, lipid peroxidation, singlet oxygen.

* A preliminary report of this study was presented at the Sixth Meeting of the International Society for Oxygen Transport to Tissue, Dortmund 1982.

§ Reprint requests and correspondence to: Y. Gauduel Laboratoire de Biophysique, Hôpital Fernand Widal, 200 rue du Fg. Saint Denis, 75010 Paris - France.

ABSTRACT.

The ability of oxygen derived free radicals to induce irreversible cellular injuries during reoxygenation was studied on isolated potassium-arrested heart preparation. Enzymatic scavengers of hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion (O_2^-), catalase and superoxide dismutase, were not effective in reversing the cardiac alterations induced by hypoxia.

Cellular injuries induced by reoxygenation, "Oxygen paradox", were partially prevented by scavengers of H_2O_2 (glutathione reduced form, catalase) and O_2^- (superoxide dismutase). The "oxygen paradox" was associated with a release of malonaldehyde. The inhibition of lipid peroxidation by α tocopherol prevented the toxic effect of molecular oxygen on hypoxic hearts. The specific quenchers of singlet oxygen (histidine) and hydroxyl radical (mannitol) reduced the peroxidation of unsatured lipids and the intensity of the "oxygen paradox" phenomenon.

The results indicate that in cardiac muscle i) oxygen derived free radicals are important byproducts of abnormal oxidative metabolism present during the post hypoxic period;
ii) the "oxygen paradox" phenomenon is related to the formation of lipid hydroperoxides leading to the cellular membrane disruption and to the irreversible alteration of cardiac integrity.

INTRODUCTION.

Oxygen deprivation induced cardiac cell injuries which were increased by the duration of the hypoxic period (15).
The toxicity of molecular oxygen is observed during aerobic reperfusion and is characterized by the development of irreversible cellular damages (8,14,16,24,25). The mechanisms of oxygen toxicity processes are still imperfectly understood. There are no conclusive works which have ascertained the mechanisms of irreversible cardiac injury during reoxygenation after hypoxia. The ability of the heart muscle to control the toxic effect of molecular oxygen depends upon complex interactions between abnormal production of very reactive species of oxygen (superoxide anion, hydrogen peroxide, oxygen singlet, hydroxyl radical) and protective mechanisms.
Recently, several studies have suggested that the pathogenesis of cardiac ischemic injury and the exacerbation of hypoxic-induced injury by reoxygenation may be ascribed to the production of activated metabolites of oxygen (18, 26, 34, 45) and lipid peroxidation (36, 37).
Selective extrinsic quenchers or scavengers of oxygen radicals are powerful tools for use in dissecting some of the complexities which are associated to abnormal oxygen utilization.
The major objective for this investigation was to test the hypothesis that free oxygen radicals may induce the cellular integrity disruption seen in reoxygenated cardiac muscle. The possible interference of the peroxidation of cardiac lipids in the development of oxygen paradox was also investigated.

MATERIALS AND METHODS.

* Animals.

Male rats of the Wistar strain, with an average weight of 325 g and fed ad libitum, were used.

* Perfusion technique.

Heparin was injected (100 iu) into the femoral vein of rats anesthetized by diethylether inhalation. The hearts were rapidly excised and arrested in cold isotonic saline solution (4°C). Retrograde, non recirculating perfusion through the aorta was performed according to the technique of Langendorff (33). The perfusate was delivered to the aortic inflow cannula at a mean pressure of 75 mm Hg. The pulmonary artery was cut in order to allow complete coronary drainage.

* Perfusion medium.

The standard perfusion fluid was a modified Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4). Before use, the perfusion fluid was filtered (Swank filter IL 200, pore size 10 µm, Extracorporeal specialities Inc). The aerobic perfusate was gassed with 95% O_2 + 5% CO_2, providing a pO_2 > 650 mm Hg. During hypoxic perfusion, the hearts were arrested by increasing the concentration of potassium from 5.5 to 16 mM with a corresponding decrease in sodium concentration. The elevation of potassium concentration prevented the occurence of hypoxia-induced cardiac arrythmias, irregular beating and provide more reproducible experimental conditions. Hypoxic periods were produced by perfusing the heart with an electrolyte solution gassed with 95% N_2 + 5% CO_2 (pO_2 < 6 mm Hg).

The water-jacketed chamber was also continuously equilibrated with the same gas mixture as the one used for the perfusion fluid of the heart. The whole perfusion apparatus was enclosed in a thermostatic chamber at 37°C. The perfusion sytem consisted of three circuits allowing rapid switch from one perfusate to the other.

* Perfusion time sequence and analytical procedure.

The isolated hearts were first perfused for 15 minutes with an aerobic perfusion fluid containing glucose (11 mM). The hearts were next submitted to hypoxia for 60 minutes. After this period, the preparations were reoxygenated for 20 minutes. Coronary flow was monitored and samples of the coronary effluent were collected at specific intervals for analysis. At the end of experiments, the cardiac muscle was blotted and weighted.

The samples were analyzed enzymatically, using an automatic dual beams spectrophotometer Perkin-Elmer 551, equipped with thermostable cuvettes and enzymatic calculator Perkin-Elmer 5-100. The release of macromolecules in the venous effluent was studied to define the integrity of the cardiac cells. Creatine kinase (CK) activity was determined with the optimized method of Siegel and Cohen (46), catalase activity released into the coronary effluent was assayed according to the method of Aebi (1). Enzymic activity was expressed in units of nanomoles of substrate converted / second per ml of perfusate (nKatal per ml). In the absence of glucose, anaerobic ATP production was estimated from the total lactate production assuming that all lactate was derived from endogenous carbohydrate and that one glucose equivalent will result in a net production of 3 ATP. Lactate production

expressed as nmol/min.g wet weight^{-1} was measured according to the method of Gutmann and Wahlefeld (19). Malonaldehyde formed in the perfused heart as a result of lipid peroxidation was determined by the Thiobarbituric method of Bernheim et al. (2). Samples of the venous effluent were precipitated with trichloracetic acid and the supernatant was incubated with thiobarbituric acid for 10 minutes at 100 °C. The amount of malonaldehyde formed was expressed in nmol/min. g w w^{-1}, using ε_{535} equal to 156 mmol. liter^{-1}.cm^{-1} (47).

* Administration of antioxidants.

Antioxidants were administered during hypoxia or reoxygenation. The glutathione reduced form, 0.5 mM, (GSH, Sigma G4251) was administered in the perfusion medium during hypoxia and reoxygenation. Catalase (EC 1,11,1,6 Boehringer) from beef liver was pulse administered every 10 minutes during the hypoxic period and every minute during the reoxygenation (total injection 20 10^4 U). Superoxide dismutase (EC 1,11,1,1 Sigma) was pulse administered through the aortic cannula at 280 U every 10 minutes during hypoxia and every minute during reoxygenation.

Alpha-tocopherol was pulse-administered through the aortic cannula at 3.5 mg every minute during the entire reoxygenated period.

* Analysis of data.

All the results were expressed as mean ± Standard error of the mean (SEM). P values were calculated by an unpaired Student's t-test and $P < 0.05$ was taken as element of significance.

RESULTS.

* CORONARY FLOW.

Coronary flow changes occuring during hypoxia and oxygen re-admission are shown in table I.

In untreated hearts, oxygen deprivation induced first a marked increase in coronary flow which lasted at least for 5 minutes and was followed by a decrease. Reoxygenation further decreased coronary flow (31%).

In hypoxic hearts perfused with reduced glutathione, catalase or superoxide dismutase, coronary flow decreased also below the prehypoxic value but these changes were partially reversed during reoxygenation.

* EFFECTS OF GSH, CATALASE AND SOD ON "OXYGEN PARADOX".

The alteration of cardiac cells integrity was estimated by the assessement of creatine kinase and catalase leakages (figure 1). The cellular injury increased with the duration of the oxygen deprivation but the aerobic reperfusion amplified the cellular damages. This toxic effect of molecular oxygen on the hypoxic heart was pO_2 dependent and was markedly diminished when arterial pO_2 was equal or lower than 150 mm Hg.

The hydrophylic protective effect of GSH is shown in figure 2 and table II. In comparison with control hearts, glutathione limited the cellular injury induced by hypoxia. This thiol compound reduced the glycolytic ATP production in the hypoxic heart (Table III).

Pulse administration of catalase during oxygen deprivation interacted neither on the glycolytic ATP production (table III)

nor on hypoxia-induced enzyme release (figure 2a and table II). Catalase and GSH, two scavengers of hydrogen peroxide, prevented the toxic action of the reoxygenation at high pO_2 (figure 2b and table II). The kinetics of CK release showed a small peak in the first minutes of oxygen re-admission. In comparison with untreated hearts, GSH and catalase decreased by 80% and 75% CK release, after twenty minutes of reoxygenation. Pulse administration of SOD during hypoxia did not alter the creatine kinase release profile or glycolytic energy production (figure 2a and table III). However, this enzymatic scavenger of the superoxide anion prevented the toxicity of reoxygenation (figure 2b and table II). In our experimental conditions, GSH was more effective than SOD or catalase on enzyme release.

* REOXYGENATION AND LIPID PEROXIDATION.

Peroxidation of cardiac unsatured lipids was studied in relation to malonaldehyde produced and released in the perfusion medium. The kinetics of malonaldehyde release are shown in figure 3. During the hypoxic perfusion, this release remained low. By contrast, the re-admission of oxygen promotes a biphasic malonaldehyde release. The first phase appeared rapidly with a maximum after two minutes of reoxygenation. The second slow phase appeared ten minutes after the start of aerobic reperfusion. Catalase, GSH and SOD reduced the oxygen-induced malonaldehyde release, and SOD was more effective than GSH or catalase (figure 3). When an antioxidant such as α tocopherol was administered during aerobic reperfusion (vitamin E, Sigma, total injection 70 mg), coronary flow was improved (table IV) and oxygen-induced enzyme release prevented (figure 4). Moreover, the peroxidation of cardiac lipids remained weak (figure 3 and table V).

* EFFECTS OF QUENCHERS OF SINGLET OXYGEN AND HYDROXYL RADICAL.

Several chemical species such as hydroxyl radical and singlet oxygen could be involved in the initiation or propagation of lipid peroxidation. In order to investigate the role of these free radicals in the development of "oxygen paradox", we used a specific trap of singlet oxygen (histidine) and a quencher of hydroxyl radical : mannitol (43). Histidine (10 mM) was used during reoxygenation. This trap of singlet oxygen lessened the oxygen toxicity on coronary flow and CK release (table IV and figure 5). This effect was more marked in the first ten minutes (table V). Concomitantly, the production of malonaldehyde was altered (figure 3 and table V).

The results obtained with mannitol are summarized in figures 3,5 and in tables IV, V. Mannitol (10 mM) was used during the post anoxic cycle. Reoxygenation slightly decreased the coronary flow (13%). The quenching of hydroxyl radical partially prevented the production of malonaldehyde and oxygen induced cellular injury.

In comparison with untreated hearts and α tocopherol group, the relation between cellular injury and lipid peroxidation level was also observed for the histidine and mannitol groups (figure 6).

TABLE I : Effect of hypoxia (60 min.) and reoxygenation (20 min.) on coronary flow in perfused hearts.

CONDITIONS	CORONARY FLOW (ml/min.g ww^{-1})							
	Control perfusion	Hypoxia				Reoxygenation		
	10 Min.	1 Min.	15 Min.	30 Min.	60 Min.	2 Min.	10 Min.	20 Min
(1) UNTREATED (n=6)	13.5 ± 0.4	21.1 ± 1.1	14.2 ± 1.0	8.5 ± 0.9	5.5 ± 0.4	4.8 ± 0.5	3.8 ± 0.6	3.8 ± 0.3
(2) SOD (n=6)	13.6 ± 0.3	20.7 ± 1.0	14.3 ± 0.8	7.7 ± 0.8	5.7 ± 0.4 ns	7.9 ± 0.3 **	7.6 ± 0.2 **	6.5 ± 0.2 **
(3) CATALASE (n=6)	13.9 ± 0.9	21.4 ± 1.5	15.9 ± 1.4	9.3 ± 1.1	5.7 ± 0.8 ns	7.0 ± 0.8 **	5.4 ± 0.3 *	5.5 ± 0.3 *
(4) GSH (n=6)	14.1 ± 0.6	20.9 ± 1.0	15.1 ± 0.6	8.6 ± 0.8	5.5 ± 0.6 ns	7.8 ± 0.5 **	6.3 ± 0.3 **	5.9 ± 0.4 **

(2), (3), (4) vs (1) * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.02$ ns : not significant

TABLE II : Total Creatine kinase release during hypoxia (60 min.) and following reoxygenation (20 min.). Results were expressed in nKat.g ww^{-1} .

CONDITIONS	HYPOXIA			REOXYGENATION	
	0 Min.	30 Min.	60 Min.	10 Min.	20 Min.
(1) UNTREATED (n=6)	5 ± 0.2	112 ± 15	264 ± 28	1209 ± 90	1834 ± 133
(2) GSH (n=6)	5.2 ± 0.2	53 ± 7	155 ± 15	228 ± 16	393 ± 20
p (2) vs (1)			*	**	**
(3) CATALASE (n=6)	6.7 ± 0.3	105 ± 13	258 ± 26	308 ± 25	483 ± 30
p (3) vs (1)			ns	**	**
p (3) vs (2)		*	*	*	*
(4) SOD (n=6)	5.1 ± 0.4	100 ± 8	235 ± 17	358 ± 23	600 ± 35
p (4) vs (1)			ns	**	**
p (4) vs (3)			ns	ns	*
(5) α TOCOPHEROL (n=5)	5.2 ± 0.3	110 ± 12	265 ± 25	125 ± 13	403 ± 22
p (5) vs (1)			ns	**	**
p (5) vs (2)			**	*	ns
p (5) vs (4)			ns	**	**

* : $p<0.05$ ** : $p<0.02$ ns: not significant

TABLE III: Lactate production and calculated total glycolytic ATP production.

CONDITIONS	Lactate production (μmol/30 min.g dry w^{-1})	Total Glycolytic ATP production (μmolATP/30 min.g dry w^{-1})
HYPOXIA [0 - 30 Min.]		
(1) Untreated (n=6)	107 ± 9	158 ± 15
(2) GSH (n=6)	75 ± 6 *	112 ± 10 *
(3) Catalase (n=6)	99 ± 11ns	148 ± 20 ns
(4) SOD (n=6)	86 ± 7 ns	128 ± 11 ns
HYPOXIA [30 - 60 Min.]		
(1) Untreated (n=6)	85 ± 9	127 ± 15
(2) GSH (n=6)	51 ± 4 *	77 ± 9 *
(3) Catalase (n=6)	78 ± 6 ns	117 ± 13 ns
(4) SOD (n=6)	61 ± 6 *	89 ± 8 *

(2), (3), (4) vs (1) * $p < 0.05$ ns:not significant

TABLE IV : Coronary flow from isolated perfused heart following the onset of hypoxia (60 min.) and reoxygenation (20 min.).

CONDITIONS	CORONARY FLOW (ml/min.g ww^{-1})							
	Control perfusion	Hypoxia				Reoxygenation		
	10 Min.	1 Min.	15 Min.	30 Min.	60 Min.	2 Min.	10 Min.	20 Min
(1) UNTREATED (n=6)	13.5 ± 0.4	21.1 ± 1.1	14.2 ± 1.0	8.5 ± 0.9	5.5 ± 0.4	4.6 ± 0.5	3.8 ± 0.6	3.8 ± 0.3
(2) α TOCOPHEROL (n=6)	13.5 ± 0.3	20.8 ± 1.0 ns	13.5 ± 1.0	8.2 ± 0.8	5.1 ± 0.8 ns	7.8 ± 0.3 **	7.3 ± 0.3 **	6.5 ± 0.2 **
(3) HISTIDINE (n=5)	13.2 ± 0.7	20.5 ± 1.2 ns	16.1 ± 0.7	9.4 ± 0.3	5.9 ± 0.6 ns	5.9 ± 0.3 *	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.1 *
(4) MANNITOL (n=5)	13.4 ± 0.7	20.4 ± 1.0 ns	13.9 ± 1.1	8.4 ± 0.3	5.3 ± 0.2 ns	6.5 ± 0.5 *	4.6 ± 0.3 ns	4.6 ± 0.3 ns

(2), (3), (4) vs (1) * : $p<0.05$ ** : $p<0.01$ ns : not significant

TABLE V : Effects of ∝ Tocopherol, Histidine (quencher of singlet oxygen) and Mannitol (quencher of hydroxyl radical) on cardiac lipid peroxidation and cellular damages induced by twenty minutes of oxygen re-admission .

The results are expressed as the % decrease from measurements made on untreated hearts. Each value is the mean ± SEM of five experiments.

OXYGEN RE-ADMISSION	∝ TOCOPHEROL	HISTIDINE	MANNITOL
0 - 10 Min.			
(1) Malonaldehyde	86.7 ± 2.6	45.7 ± 2.5	70.0 ± 3.6
(2) Creatine Kinase	90.0 ± 3.8	49.7 ± 2.8	52.9 ± 2.5
10 - 20 Min.			
(3) Malonaldehyde	85.3 ± 2.4 ns	48.0 ± 2.4 ns	73.8 ± 3.9 ns
(4) Creatine Kinase	57.1 ± 1.7 *	34.4 ± 2.7 *	52.3 ± 2.4 ns

(4) vs (2) and (3) vs (1) * : $p < 0.05$ ns: not significant.

LEGENDS.

Figure 1 Total Creatine kinase (a) and catalase (b) release during oxygen deprivation and reoxygenation.
Each point is the mean ± SEM of six experiments.
●—● Hypoxia; ●- -● Hypoxia and reoxygenation (pO_2=670 mm Hg); ●- -● Hypoxia and reoxygenation (pO_2=150 mm Hg); △—△ Aerobic perfusion.

Figure 2 (a) Creatine kinase release profiles (nKat. gw w^{-1}) from isolated perfused hearts following the onset of oxygen deprivation.
(b) Effects of the reoxygenation on creatine kinase release from perfused hearts previously submitted to 60 minutes of hypoxia.
Each point is the mean ± SEM of six experiments.
●—● Untreated hearts; ○—○ Glutathione reduced form; □—□ Catalase; ■—■ Superoxide dismutase.

Figure 3 Malonaldehyde release in perfused hearts submitted to 60 minutes of hypoxia and 20 minutes of reoxygenation. The degree of lipid peroxide formation is calculated as nmol/min. g ww^{-1}.
Each point is the mean ± SEM of five experiments.
●—● Hypoxic hearts; ●···● Untreated hearts; ○—○ Histidine; □—□ Mannitol; ○—○ Glutathione reduced form; ■- -■ Catalase; ■—■ Superoxide dismutase; ⊙—⊙ α Tocopherol.

Figure 4 Protective effect of ∝tocopherol (vitamin E) on reoxygenated hearts, previously submitted to 60 minutes of oxygen deprivation .

● ● Untreated hearts (n=6);⊙ ⊙ ∝Tocopherol (n=6).

Figure 5 Enzyme release curves of creatine kinase (nKat/min.g ww^{-1}) during oxygen deprivation and following reoxygenation.

-●—●-Untreated hearts (n=6); -○—○-Histidine (n=5); -□—□-Mannitol (n=5).

Figure 6 Relationship between creatine kinase release and malonaldehyde formation in reoxygenated hearts.
The plotted points for each group represent 5 (■), 10 (○), 15 (⊙) and 20 minutes (●) of oxygen re-admission.

----- Untreared hearts (n=6); — — Histidine (n=5); ——— Mannitol (n=5); —·—·—∝Tocopherol (n=5).

Figure 7 Suggested sequential events occuring in reoxygenated cardiac cells.
During oxygen-induced enzyme release, the oxygen paradox may result in a sudden increase oxygen radicals flux and irreversible cellular injuries including mitochondrial swelling, mechanical stress and membrane disruption.

DISCUSSION.

These results provide evidence that the "oxygen paradox" phenomenon is mediated by the production of oxygen derived free radicals in cardiac cells.

In accordance with previous studies (25), oxygen deprivation induces a slight creatine kinase release characterized by an initial peak and a broad plateau. At the same time, catalase, a constituent of the heart mitochondria matrix (40) leaks from oxygen deprived cardiac muscle.

Exogenous scavengers of hydrogen peroxide (catalase) and superoxide anion (superoxide dismutase) do not protect the hypoxic myocardium. This result concurs with the study of Pryor (42) who suggested that oxygen derived free radicals were unlikely to play a prominent role during hypoxia since oxygen radical generation was limited in the absence of molecular oxygen.

By contrast, the glutathione reduced form, which has a scavenging potential in the ionic environnement of cell (32,42) exerts a protective action on oxygen depleted cardiac muscle.

The effect of this thiol compound, used with a concentration which could not induce swelling or lysis of mitochondria (27), can be linked to the limitation of glycolytic activity and endogenous glycogen depletion.

One of the first manifestation of cardiac injury promoted by oxygen re-admission is the abnormal reaction of cells to molecular oxygen (16,24). The extent of hypoxia-induced myocardial cell damage is exacerbated by sudden reoxygenation. The decrease in enzyme washout, observed with different scavengers of actived oxygen species is associated with the improvement of coronary

flow and may not be attributed to a "no reflow" phenomenon. So, the amounts of enzyme released from reoxygenated heart are proportional to the number of injured cardiac cells (15). The beneficial effect of GSH on reoxygenated hearts may be due to the improvement of the cellular glutathione status since this status is normally reduced by hypoxia (18). Thus, exogenous GSH can be used by thiol transferase enzymes and glutathione peroxidase to slacken oxygen-induced lipid peroxidation and reduce the toxic action of hydrogen peroxide. This hypothesis is confirmed by the beneficial action of catalase. This enzyme plays a fundamental role in the cellular metabolism of hydrogen peroxide (5,28,41) and is able to limit the toxic effect of this oxidant on the reoxygenated cardiac cells.

It is not unlikely that deleterious production of hydrogen peroxide is operated by a dismutation of the superoxide anion (3,4,35,41). Our study demonstrates the role of superoxide anion in the initiation of "oxygen paradox". The protective effect of exogenous SOD to partially prevent oxygen toxicity is strenghtened by the capacity of this enzyme to react with the superoxide anion and neutralize the interaction of O_2^- with cardiac lipids (7,10,11,12,52).

The results presented in this paper indicate that the peroxidation of cardiac lipids, estimated by the thiobarbituric acid test, is triggered by the readmission of oxygen to the hypoxic hearts. This finding agrees with the studies of Guarnieri et al. (18) who reported malonaldehyde accumulation in reoxygenated cardiac tissue. The lipid peroxides are powerful inhibitors of many enzymes. They interact with proteins (44) and will cause severe tissue damages including increase of

membrane permeability. This fact is confirmed by the relation which exists between the rates of creatine kinase and malonaldehyde releases. Therefore, the cardiac "oxygen paradox" will be largely dependent on the autoxidation of polyunsatured fatty acids in cell membranes. Although superoxide anion is generally considered not to react with lipids (29) but with hydroperoxides (51), the participation of this radical in the peroxidation of lipids is evident during the reoxygenation. This result confirms the hypothesis of Guarnieri et al. (18). Consequently, when the chain reactions in lipids are blocked by an hydrophobic scavenger such as ∝ tocopherol (21,42,50), the "oxygen paradox" phenomenon is totally prevented. In agreement with the study of Guarnieri et al. (17), the protective effect of ∝ tocopherol may be due to the limiting effect of this antioxidant on lipid peroxides formation induced by reoxygenation.

Among the other mechanisms which may promote lipid peroxidation (9), the activity of the hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) and singlet oxygen must be taken into account. In fact, cardiac oxidative injury is sensitive to hydroxyl radical and singlet oxygen trapping agents. During the "oxygen paradox", the hydroxyl radical, which is formed by reactions still subject to controversy (6,20, 21,31) , may promote cellular damage. The protection of myocardium with $OH^{\bullet}$ scavenger (mannitol) cannot be due to an hyperosmotic effect of this compound because the tissue water content (wet weight/dry weight ratio) was not modified after twenty minutes of reoxygenation: untreated hearts 5.75 + 0.06, mannitol 5.67 + 0.07.

The ability of histidine, a specific quencher of singlet oxygen (48), to limit the oxygen-induced cell damage indicates that singlet oxygen can be directly involved in the "oxygen paradox".

Singlet oxygen fragments the lipid hydroperoxides (23) and reacts with unsatured lipids of biomembranes (30,49) to modify membrane permeability. The fact that effect of histidine is more marked at the onset of reoxygenation than 10 minutes after may suggest that the interactions of singlet oxygen with cellular components are essential to enhance the toxicity of molecular oxygen. Therefore the prolonged decrease of cardiac oxygen availability induces chemical alterations of the free radical scavenging mechanisms. The toxicity of reoxygenation may result in an abnormal free radicals load in the cardiac cells. This load will be dependent on oxygen tension (42) and modulates the intensity of the "oxygen paradox" (figure 7).
It is difficult to precisely determine the degree of participation of each oxygen radical in the initiation and propagation of lipid peroxidation in the whole reoxygenated heart. However, as suggested by Chance et al. (5), hydroxyl radical and other oxidizing species may be incriminated in the peroxidation of cellular lipids. The interferences of oxygen derived free radicals in the oxidative attack of the reoxygenated heart do not reverse the mechanisms of oxygen-induced enzyme release that Ganote and Kaltenbach have described (14). In the reoxygenated heart, the peroxidation of lipids membranes may contribute to impair the control mechanisms of transmembrane ion movements. The abnormal cellular movements of calcium or other ion will be dependent on the membrane permeability changes induced by the oxygen derived free radicals. In addition, during aerobic reperfusion, the sudden cellular injuries which include swelling and lysis of mitochondria (8) are associated with the reoxidation of the electron chain transfer (13,24) and may be triggered by the abnormal activity of respiratory enzymes.Our results are in

agreement with these hypothesis. The unphysiological activity of electron transfer can lead to alteration of membrane mitochondria (38) and to deleterious production of oxygen radicals in the intracellular space.

Acknowledgements.

We are grateful to Pr. G. Nahas for his helpful discussions and criticisms during the preparation of this paper.
This work was supported by contract from DGRST and grants from the University Paris VII and the Fondation pour la Recherche Médicale Française.

REFERENCES

1. AEBI, H. Methods of Enzymatic Analysis. Edited by H.U. Bergmeyer, 2° edition. Academic Press, New York . pp 673-685 (1974).

2. BERNHEIM, F., BERNHEIM, M.L.C. & WILBUR, K.M. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. Journal of Biological Chemistry 174, 257-264 (1948).

3. BOVERIS, A. In Oxygen and Physiological function. Edited by F.F. Jobsis. Professional information library. pp 67-82 (1977).

4. BOVERIS, A. & CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen . Biochemical Journal 134, 707-716 (1973).

5. CHANCE, B., SIES, H. & BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiological Reviews 59, 527-605 (1979).

6. CZAPSKI, G. & ILAN, Y.A. On the generation of the hydroxylation agent from superoxide radical. Can the Haber-Weiss reaction be the source of $OH^{\bullet}$ radicals ? Photochemistry and Photobiology 28, 651-653 (1978).

7. Del MAESTRO, R.F. The influence of oxygen derived free radicals on "in vitro" and "in vivo" model systems. Interactions of superoxide anion radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. Diss. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala, abstract 340 (1979).

8. FEUVRAY, D. & de LEIRIS, J. Ultrastructural modifications induced by reoxygenation in the anoxic isolated rat heart perfused without exogenous substrate. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 7, 307-314 (1975).

9. FONG, K.L., Mc CAY, P.B., POYER, J.L., KEELE, B.B. & MISRA, H. Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. Journal of Biological Chemistry, 248, 7792-7797 (1973).

10. FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. Annual Review of Biochemistry, 44, 147-159 (1975).

11. FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; Superoxide dismutase provide an important defense. Science, 201, 875-880 (1978).

12. FRIDIVICH, I. Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic life style. Photochemistry and Photobiology, 28, 733-741 (1978).

13. GANOTE, C.E., Mc GARR, J., LIU, S.T. & KALTENBACH, J.P. Oxygen-induced enzyme release. Assessment of mitochondrial function in anoxic myocardial injury and effects of the mitochondrial uncoupling agent 2,4 dinitrophenol (DNP). Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 12, 387-408 (1980).

14. GANOTE, C.E. & KALTENBACH, J.P. Oxygen-induced enzyme release: early events and a proposed mechanism. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 11, 389-406 (1979).

23. HAWCO, F.J., O'BRIEN, C.R. & O'BRIEN, P.J. Singlet oxygen formation during hemoprotein catalyzed lipid peroxide decomposition. Biochemical and Biophysical Research Communications, 76, 354-361 (1977).

24. HEARSE, D.J. The oxygen paradox and the calcium paradox: Two facets of the same problem? Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 10, 641-668 (1978).

25. HEARSE, D.J., HUMPHREY, S.M. & CHAIN, E.B. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested rat heart: a study of myocardial enzyme release. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 5, 395-407 (1973).

26. HESS, M.L., OKABE, E. & KONTOS, H.A. Proton and free oxygen radical interaction with the calcium transport system of cardiac sarcoplasmic reticulum. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 13, 767-772 (1981).

27. HUNTER, E., SCOTT, J.A., HOFFSTEN, P.E., GEBICKI, J.M., WEINSTEIN, J. & SCHNEIDER, A. Studies on the mechanism of swelling , lysis and distintegration of isolated liver mitochondria exposed to mixtures of oxidized and reduced glutathione. Journal of Biological Chemistry, 239, 614-622 (1964).

28. JONES, D.P., EKLOW, L., THOR, H. & ORRENIUS, S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H_2O_2. Archives of Biochemistry and Biophysics, 210, 505-516 (1981).

29. KASCHNITZ, R.M. & HATEFI, Y. Lipid oxidation in biological membranes. Electron transfer protein as indicators of lipid autoxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 171, 292-303 (1975).

30. KELLOGG, E.W. & FRIDOVICH, I. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. Journal of Biological Chemistry, 250, 8812-8817 (1975).

31. KOPPENOL, W.A., BUTLER, J. & VAN LEEUWEN, J.W. The Haber-Weiss cycle. Photochemistry and Photobiology, 28, 655-660 (1978).

32. KOSOWER, N.S. & KOSOWER, E.M. The glutathione-glutathione disulfide system. In "Free radicals in Biology" Edited by W.A. Pryor, Academic Press, London, 2, 55-84 (1976).

33. LANGENDORFF, O. Untersuchungen am Über lebender Säugerthier-herzen. Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere 61, 291-332 (1895).

34. LEFER, A.M., ARAKI, H. & OKAMATSU, S. Beneficial actions of a free radical scavenger in traumatic shock and myocardial ischemia. Circulatory Shock, 8, 273-282 (1981).

35. LOSCHEN, G., AZZI, A. & FLOHE, L. Mitochondrial H_2O_2 formation: relationship with energy conservation. FEBS Letters 33, 84-88 (1973).

36. MEERSON, F.Z., KAGAN, V.E., ARKHIPENKO, Y.V., BELKINA, L.M. & ROZHITSKAYA, I.I. Prevention of lipid peroxidation activation and myocardial antioxidant system damage in stress and experimental infarction. Kardiologiya, 21, 55-60 (1981).

37. MEERSON, F.Z. & USTINOVA, E.E. Prevention of stress damage to the heart and its hypoxic contraction with the natural antioxidant α tocopherol. Kardiologiya, 22, 89-94 (1982).

38. NARABAYASHI, H., TAKESHIGE, K. & MINAKAMI, S. Alteration of inner membrane components and damage to electron tranfer activities of bovine heart submitochondrial particles induced by NADPH dependent lipid peroxidation. Biochemical Journal 202, 97-105 (1982).

39. NOHL, H. & HEGNER, D. Do mitochondria produce oxygen radicals "in vivo"? European Journal of Biochemistry 82, 563-567 (1978).

40. NOHL, H. & HEGNER, D. Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat heart mitochondria. FEBS Letters 89, 126-130 (1978).

41. NOHL, H. & JORDAN, W. The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide . European Journal of Biochemistry 111, 203-210 (1980).

42. PRYOR, W.A. Free radicals, Mc Graw-Hill, New York (1966).

43. PRYOR, W.A. The formation of free radicals and the consequence of their reaction in vivo. Photochemistry and Photobiology 38, 787-801 (1978).

44. ROUBAL, W.T. & TAPPEL, A.L. Damage to proteins, enzymes and amino acids by peroxidizing lipids. Archives of Biochemistry and Biophysics 113, 5-8 (1966).

45. SHLAFER, M., KANE, P.F., WIGGINS, V.Y. & KIRSH, M.M. Possible role for cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury. Circulation, 66, Suppl.I, I-86 - I-92 (1982).

15. GANOTE, C.E., SEABRA GOMES, R., NAYLER, W.G. & JENNINGS, R.B. Irreversible myocardial injury in anoxic perfused rat hearts. American Journal of Pathology, 80, 419-450 (1975).

16. GAUDUEL, Y., KARAGUEUZIAN, H.S. & de LEIRIS, J. Deleterious effects of endogenous catecholamines on hypoxic myocardial cells following reoxygenation. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 11, 717-731 (1979).

17. GUARNIERI, C., FERRARI, R., VISIOLI, O., CALDARERA, C.M. & NAYLER, W.G. Effect of α-Tocopherol on hypoxic perfused and reoxygenated rabbit heart muscle. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 10, 893-906 (1978).

18. GUARNIERI, C., FLAMIGNI, F. & CALDARERA, C.M. Role of oxygen in the cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 12, 797-808 (1980).

19. GUTMANN, I. & WAHLEFELD, A.W. Methods of Enzymatic Analysis. Edited by H.U. Bergmeyer, 2° edition. Academic Press, New York. pp 1464-1468 (1974).

20. HABER, F. & WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proceedings of the Royal Society, A, 147, 332-351 (1934).

21. HALLIWELL, B. Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. Cell Biology International Reports, 2, 113-128 (1978).

22. HAUGAARD, N. Cellular mechanisms of oxygen toxicity. Physiological Reviews, 48, 312-362 (1968).

46. SIEGEL, A.L. & COHEN, P.S. Methods of Enzymatic Analysis. Edited by H.U. Bergmeyer, 2º edition. Academic Press, New York, 2, 793-797 (1974).

47. SINNHUBER, R.O. & YU, T.C. II. The quantitative determination of malonaldehyde . Food Technology 12, 9-12 (1958).

48. SPIKES, J.D. & SWARTZ, H.M. International conference on singlet oxygen and related species in chemistry and biology review and general discussion. Photochemistry and Photobiology 28, 921-933 (1978).

49. SVINGEN, B.A., O'NEAL, F.O. & AUST, S.D. The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation. Photochemistry and Photobiology 28, 803-809 (1978).

50. TAPPEL, A.L. & ZALKIN, H. Inhibition of lipid peroxidation in mitochondria by vitamin E. Archives of Biochemistry and Biophysics 80, 333-336 (1959).

51. THOMAS, M.J., MEHL, K.S. & PRYOR, W.A. The role of superoxide anion in the xanthine oxidase induced autoxidation of linoleic acid. Biochemical and Biophysical Research Communications 83, 927-932 (1978).

52. ZIMMERMANN, R., FLOHE, L., WESER, U. & HARTMANN, H.J. Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase. FEBS Letters 29, 117-120 (1973).

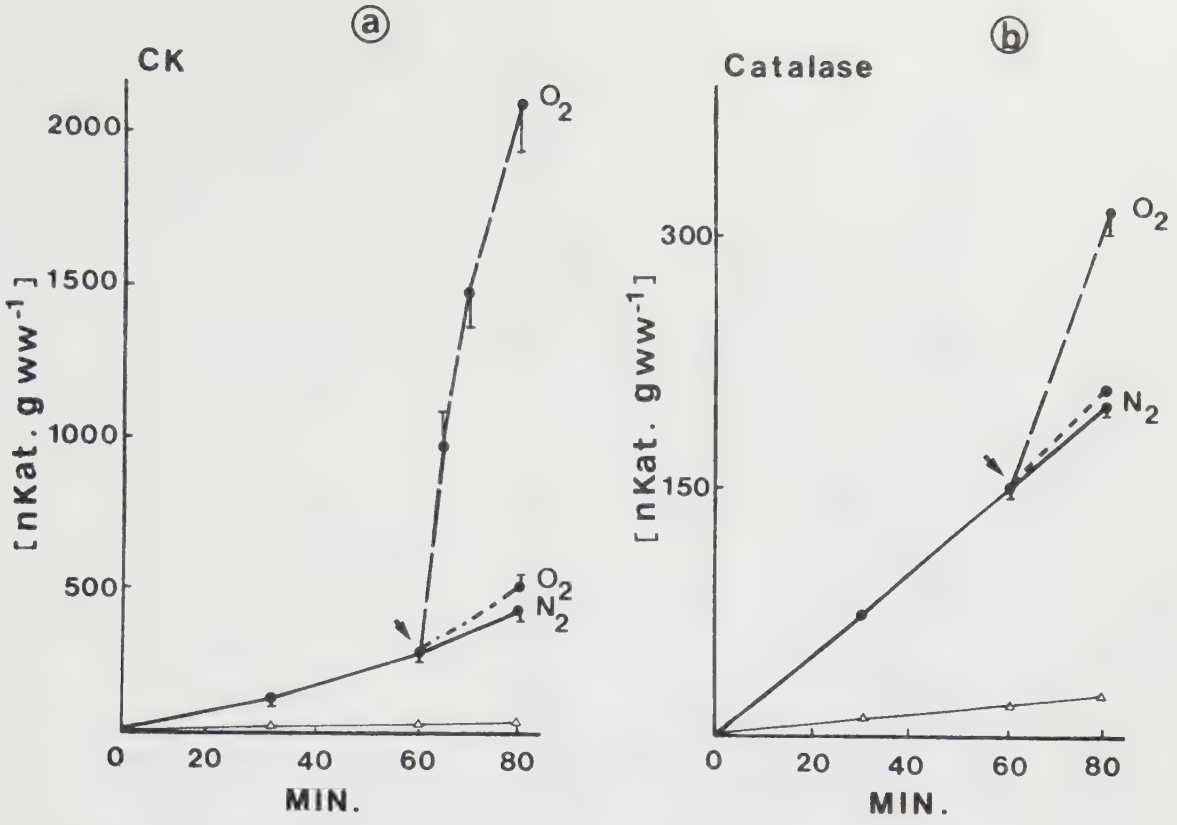
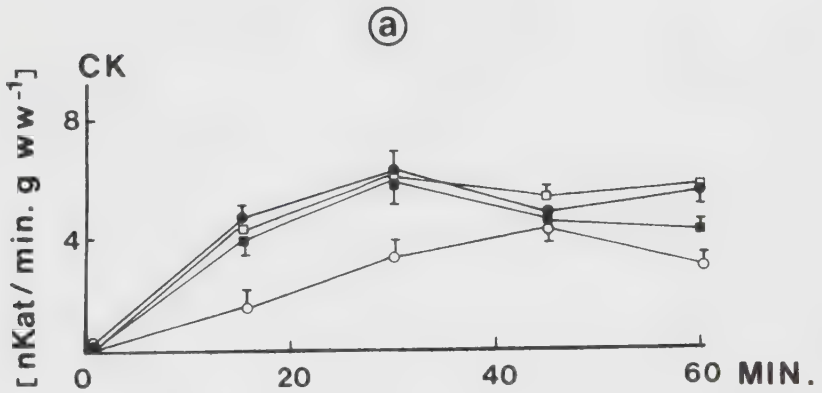

a
CK
2000
1500
1000
500
[nKat. g ww^{-1}]
O_2
O_2
N_2
0
20
40
60
80
MIN.
b
Catalase
300
150
[nKat. gww^{-1}]
O_2
N_2
0
20
40
60
80
MIN.

FIG 1


a
CK
8
4
[nKat/ min. g ww^{-1}]
0
20
40
60 MIN.

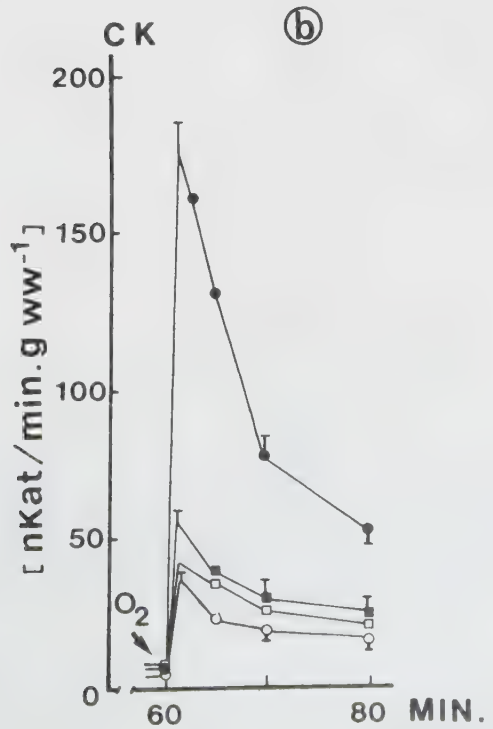

CK
b
200
150
100
50
0
[nKat/min.g ww^{-1}]
O_2
60
80 MIN.

FIG 2

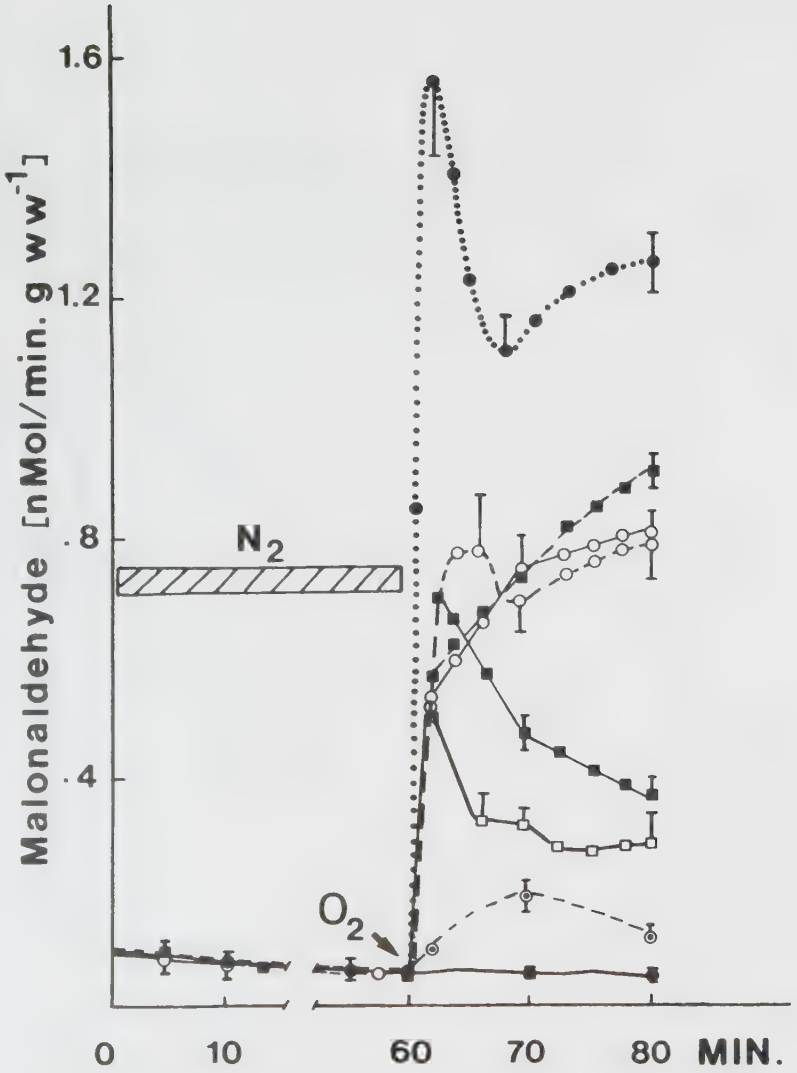

Malonaldehyde [nMol/min. g ww^{-1}]
1.6
1.2
.8
.4
N_2
O_2
0
10
60
70
80
MIN.

FIG 3

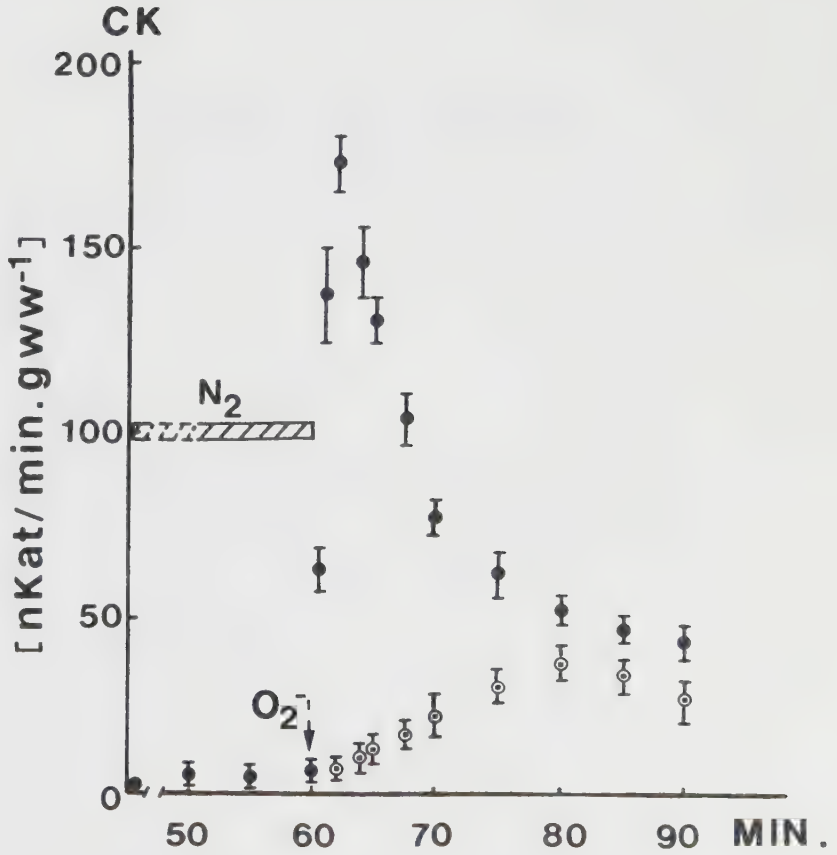

CK
[nKat/ min. gww^{-1}]
200
150
100
50
0
N_2
O_2^-
50
60
70
80
90
MIN.

FIG 4

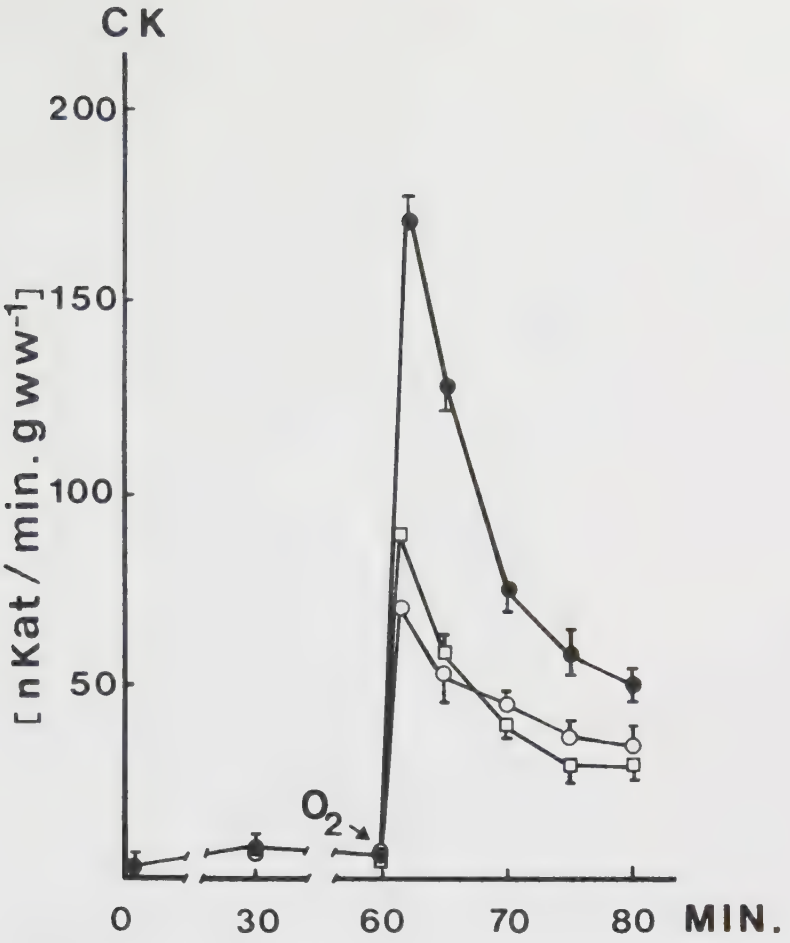

CK
200
150
100
50
[nKat / min. g w w^{-1}]
O_2
0
30
60
70
80
MIN.

FIG 5

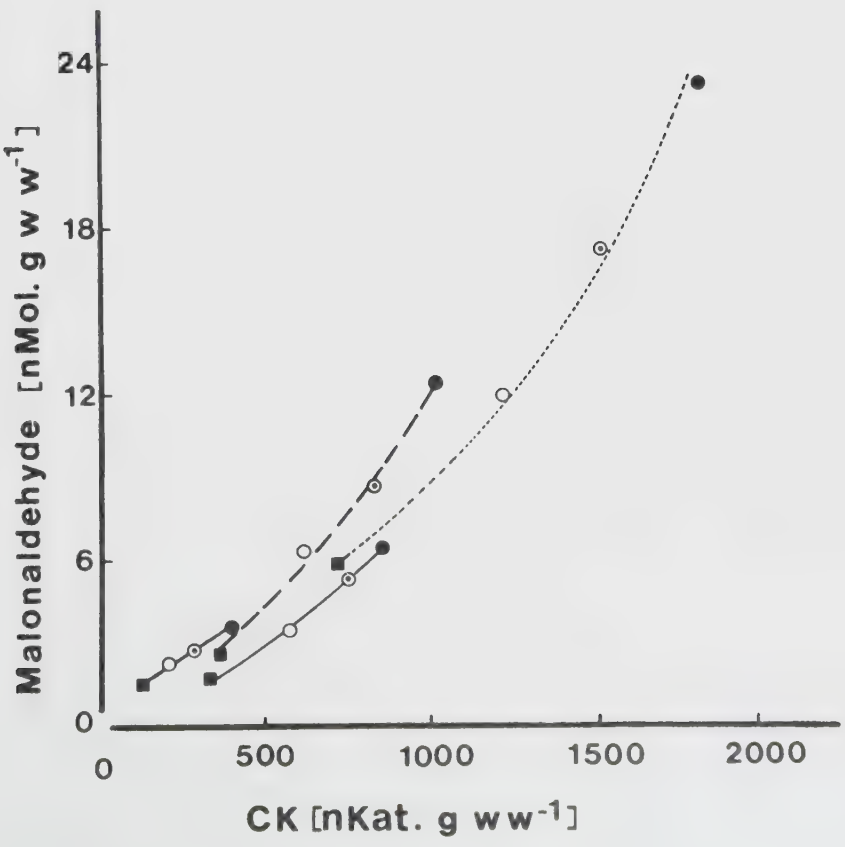

24
18
12
6
0
Malonaldehyde [nMol. g w w^{-1}]
0
500
1000
1500
2000
CK [nKat. g w w^{-1}]

FIG 6

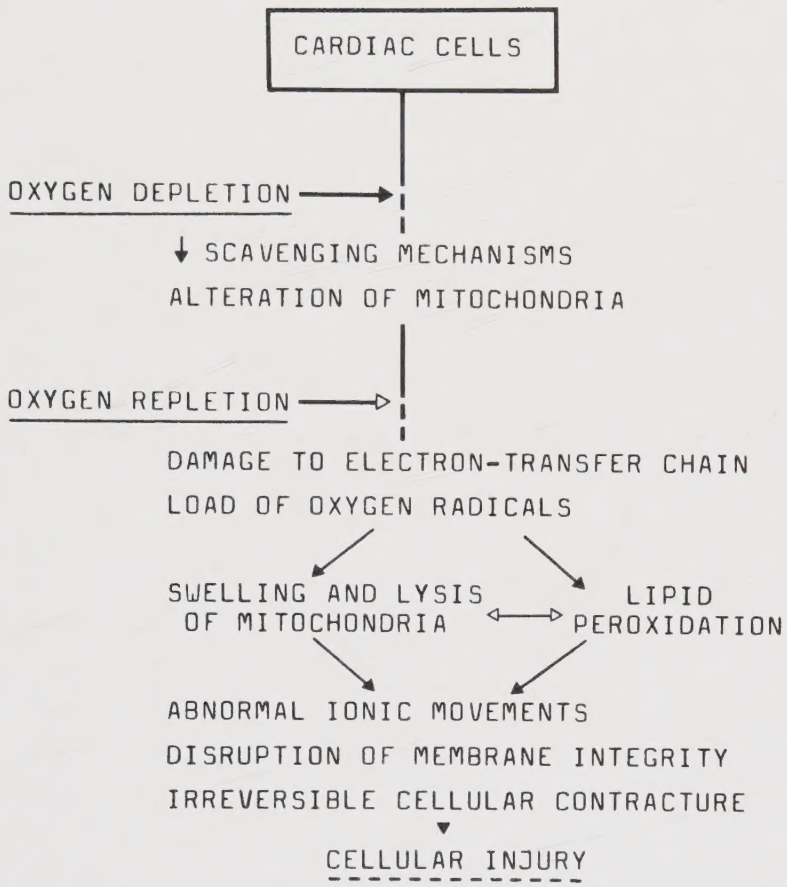

CARDIAC CELLS
OXYGEN DEPLETION
SCAVENGING MECHANISMS
ALTERATION OF MITOCHONDRIA
OXYGEN REPLETION
DAMAGE TO ELECTRON-TRANSFER CHAIN
LOAD OF OXYGEN RADICALS
SWELLING AND LYSIS OF MITOCHONDRIA
LIPID PEROXIDATION
ABNORMAL IONIC MOVEMENTS
DISRUPTION OF MEMBRANE INTEGRITY
IRREVERSIBLE CELLULAR CONTRACTURE
CELLULAR INJURY

FIG 7

RESUME

L'objet du présent travail est d'étudier deux aspects de l'utilisation de l'oxygène par le muscle cardiaque : conséquences de la limite aérobie et effets cytotoxiques de la réoxygénation.

La limite aérobie correspond à une altération des caractéristiques hémodynamiques du myocarde et à un remaniement des différents réservoirs énergétiques cellulaires,à l'exception de la créatine phosphate. La phosphorylation oxydative mitochondriale est impliquée dans l'élaboration d'une information métabolique destinée à réguler l'oxygénation tissulaire locale; cette information pourrait être le potentiel phosphate cytoplasmique.

La cytotoxicité de l'oxygène sur le myocarde hypoxique est associée à une déviation du métabolisme oxydatif qui favorise la production d'espèces activées de l'oxygène et la peroxydation des lipides insaturés cellulaires. La réoxydation de la chaine respiratoire mitochondriale est compromise dans la réduction anormale de l'oxygène en radicaux.

MOTS-CLES : - Myocarde
- Limite aérobie
- Radicaux de l'oxygène
- Peroxydation lipidique